

# 富山医科薬科大学医学会誌

## TOYAMA MEDICAL JOURNAL

第3巻 第1号

平成2年3月

### — 目 次 —

#### シンポジウム「腫瘍マーカーの再評価と将来展望」

- 司会のことば……………矢野 三郎, 藤岡 基二 1—2
1. HPLC法を用いた血清蛋白成分中の癌関連分画検討……………西出 良一 3—7
2. 乳癌における癌遺伝子産物の免疫組織学的検討  
——c-erbB-2 productを中心に—— 田内 克典, 長村 義之, 藤巻 雅夫 8—12
3. 肺癌における5種腫瘍マーカー測定の意義……………水島 豊 13—15
4. 多変量解析システムの肺癌診断への応用……………斎藤 清二 16—19
5. 前立腺癌における腫瘍マーカー  
……………布施 秀樹, 梅田 慶一, 坂井 健彦, 藤城 儀幸,  
水野 一郎, 風間 泰蔵, 片山 喬 20—24
6. 婦人科領域における腫瘍マーカーの現況——とくにCA125について——  
……………新居 隆 25—28

#### 就任講演

- 肝性脳症の病態と治療——潜在性脳症を中心に——……………渡辺 明治 29—31

#### 最終講義

- 「ウイルス学」……………庭山清八郎 32—35

#### 原 著

- 非肥満ヒトII型糖尿病の動物モデルNONマウスの耐糖能異常の成因に関する研究  
……………森岡 尚夫, 大角 誠治, 沢 丞, 矢野 三郎 36—44
- 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による癌患者血清および肺癌気管支洗滌液中  
蛋白分画に関する臨床的研究  
……………西出 良一, 龍村 俊樹, 村上 新, 小山 信二 45—52

- 松田健史先生を偲んで……………53

#### 記 事

- 第23回～26回富山医科薬科大学医学会学術集会(題名)……………54—55
- 第3回富山医科薬科大学電子顕微鏡懇話会(題名)……………55
- 第4回富山医科薬科大学電子顕微鏡懇話会(抄録)……………56—61
- 第9回富山医科薬科大学放射性同位元素実験施設利用者研究発表会(抄録)……………62—64
- 第16回富山医科薬科大学血管懇話会(記録)……………64
- 雑 報 学位授与 課程博士・論文博士(平成元年度)……………65—67
- 富山医科薬科大学医学会会則……………68
- 富山医科薬科大学医学会役員……………69
- 「Toyama Medical Journal」投稿規定……………70—71
- 編集後記……………72



## シンポジウム

### 「腫瘍マーカーの再評価と将来展望」

#### 司 会 の こ と ば

矢 野 三 郎\*, 藤 岡 基 二\*\*

富山医科薬科大学内科学第 1 教室\*, 生化学第 2 教室\*\*

今回、富山医科薬科大学医学会がシンポジウムのテーマを公募したところ、腫瘍マーカーをあげたものがもっとも多かった。この理由の一つは日常の診療で各種のマーカーが頻用されているにもかかわらず、なお未解決の問題がたくさん残っている点にあると思う。そこでお互い直面している困難な問題を出し合い、シンポジウム場で理解を深め、解決点を見出してゆきたいという考えがあったのかもしれない。さらにまた、癌の診断に苦勞している臨床家の立場からすると、腫瘍マーカーに対する期待感が大きい。幸い、本学におけるこの方面の研究もかなり充実、進展してきたので、ここに本シンポジウムを開催する運びになった。

腫瘍マーカーがいつ頃から注目されるようになったかという点、1960年、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)の発見に始まるというよいであろう。これは $\alpha$ -グロブリン分画中の胎児性蛋白でとくに肝細胞癌のマーカーとして現在でも活用されている。ついで1965年には carcinoembryonic antigen(CEA)が発見されている。これも癌胎児蛋白で、とくに消化器系の癌や肺癌のマーカーとして応用されている。これら AFP や CEA の発見によってマーカーの研究が活発になってきたと考えられる。これ以前にもいわゆる癌反応というものについては多くの研究が行われているが、信用できるものはなかった。

腫瘍マーカーの発見により、当初は癌の早期診断に大きな期待がもたれたわけであるが、残念ながら感度も精度も悪く、現在でもせいぜい診断の確認か、経過観察の指標に用いられているに過ぎないといえる。血液を一滴採取して悪性腫瘍の早期発見をする

というのは理想であるが、今なおその可能性はない。しかし、最近になって腫瘍の生化学的、免疫学的研究が一段と進歩し、一方、血中微量物質の測定法についてもかなりの進歩がみられるようになり、腫瘍マーカーの研究も新しい時代を迎えている。さらに AFP, CEA につづいて、新しいマーカーが相次いで見出されており、いくつかのマーカーを組合せて診断率の向上を目指すという方法論も研究されており、また血液を試料とする代わりに組織や細胞を試料として免疫組織化学染色などを用いて診断に応用しようという試みもある。

本日のシンポジウムでは基礎的な立場から 2 名、臨床的な立場から 4 名の方に発表をお願いしてあるが、発表中にでてくるとと思われる AFP, CEA 以外の主要なマーカーについて概説しておくのと次のとおりである。

#### 1) basic fetoprotein (BFP).

塩基性の胎児性蛋白で、腎、胃、大腸、肝の癌組織に存在する。泌尿器系癌では尿中に排泄される。

#### 2) squamous cell carcinoma related antigen (SCC).

扁平上皮癌関連抗原。子宮、上顎、食道、肺の癌診断に応用されている。扁平上皮癌が作る糖蛋白抗原。

#### 3) carbohydrate antigen (CA19-9).

膵臓癌、胆嚢癌、胆管癌のマーカー。培養大腸癌細胞を抗原として作られたモノクローナル抗体 NS 19-1 が識別する細胞膜上のシアル酸を含んだ糖鎖抗原。

#### 4) CA125

卵巣癌培養細胞を抗原として作られたモノクローナ

ール抗体 OC125 が識別するムチン抗原。卵巣の漿液性腺癌，卵巣癌，子宮内膜癌のマーカー。

5) DU-PAN-2

ヒト膵癌培養細胞に対して作製されたモノクローナル抗体により識別される癌関連抗原。CA19-9 の陰性例でも検出されるという。

6) tissue peptide antigen (TPA)

癌細胞から抽出された多くの癌に共通するペプチド抗原。

7) neuron specific enolase (NSE)

解糖系酵素の一種で，神経内分泌細胞由来の腫瘍あるいは肺小細胞癌などで産生されることが知られている。

## HPLC 法を用いた血清蛋白成分中の癌関連分画検討

西 出 良 一

富山医科薬科大学外科学第 1 教室

### はじめに

私どもは、癌患者の糖蛋白分画中の fucose 値を、非癌疾患患者および正常人とともに分析検討し、癌患者におけるその測定値の上昇が診断、病期の進行程度、予後の評価、さらに治療効果等の判定上、有用なパラメーターになることを認め発表してきた<sup>1,2)</sup>。今回の研究の目的は、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, 以下 HPLC) 等による蛋白分析技術を駆使して、上記の物質中より癌関連分画を解析するとともに、その分画を採取し、その分画の特質を明らかにすると同時に、本研究の臨床応用を可能にすることにあり、各方面よりの検討を試みた。

### 対象および方法

#### A) HPLC 法による血清等の蛋白分析

##### I. 血清蛋白の分析

対象は悪性腫瘍患者105名 (悪性腫瘍群)、良性腫瘍患者20名、心臓血管疾患患者28名 (以上非悪性腫瘍群)、健常者40名、あわせて193名である。悪性腫瘍群の内訳は、肺癌73例、胃癌15例、乳癌8例、他9例である。

実験方法は、日立製の高速液体クロマトグラフィー、波長可変 UV モニター、プロセッサーを使用し、カラムは解析至適分子量が2000~数万である TSK-gelG200sw を、溶離液は 0.2M 磷酸緩衝液 (pH6.9) + 0.2M NaCl を用いて、流速 0.7ml/min, 検出は UV254nm とし、血清 5 $\mu$ l を注入した。そこで保持時間 (retention time: 以下 RT) 30分から50分までの分画を採り、各測定値を次式を用いて換算し統計学的検討を行った。

$$\text{RTx/RT30-50} \times 100 \\ (\text{RT30-50 ; RT30 から RT50 までの総和})$$

群間の平均値の差の検定は、分散分析後、Student t-test を行った。また、肺癌患者47例に対し CEA, TPA を、またそれらのうち30例に対しては PHA, ConA を同時に測定している。

#### II. 肺癌患者の気管支洗浄液中蛋白の分析

肺癌患者で片側にのみ病変を認めた10例を対象とした。気管支鏡検査による観察確認終了後に、腫瘍が占拠する肺葉気管支、および対側気管支にそれぞれ生食水約 20ml を注入洗浄した後、吸引回収したものを検体に供した。患側と対側との間で、血清と同様に統計学的検討を行った。

#### B) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

HPLC 測定により癌患者において有意に上昇した RT34 分画をさらに HPLC にて分抽を重ねた後、凍結乾燥し、蒸留水で再溶解して血清中濃度の約50倍としたものを試料とした。泳動は、15% SDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲルサイズ16×16、厚さ1.0 mm)を作製し、試料 10 $\mu$ l を測定に用い、25mA で4時間通電した。Merril ら<sup>3)</sup>の方法にしたがって銀染色を行い、530nm と 660nm との2波長法により測定した。

### 結 果

#### A) HPLC 法

##### 1. 血清蛋白の分析

各分画の分画比を検討したところ、RT34 分画に於て、悪性腫瘍群で $8.23 \pm 4.75$ 、良性腫瘍患者で $2.14 \pm 2.18$ 、心臓血管疾患患者で $2.68 \pm 2.31$ 、健常者で $2.50 \pm 1.36$ と、悪性腫瘍群で有意( $p < 0.001$ )に高値を示した。なお、非悪性腫瘍群における良性腫瘍患者、心臓血管疾患患者、および健常者との間に有意差は認められなかった。cut off 値6.0を設定し、6.0以上を陽性とする、非悪性腫瘍群および健常者での陽性率は 3.4%、悪性腫瘍群での陽性率は70.4

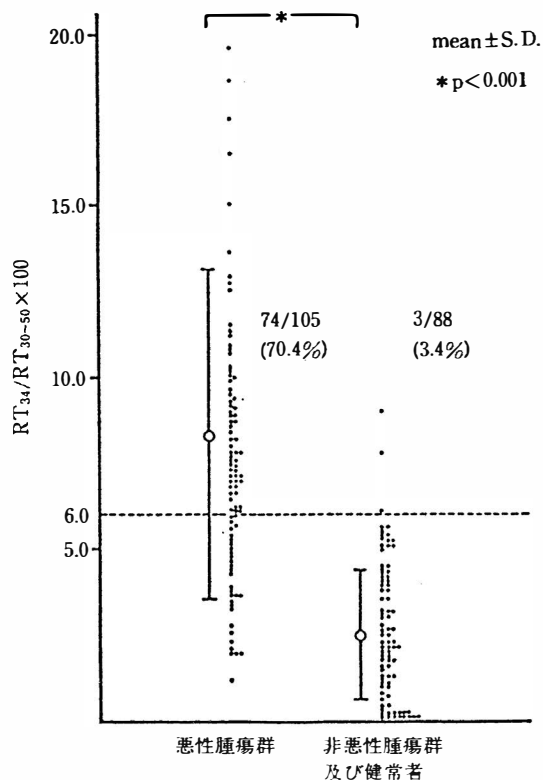


図1 悪性腫瘍群・非悪性腫瘍群のRT34 分画比及び陽性率 (cut off 値: 6.0)

%となる(図1)。それらのうち、肺癌患者についてRT34 分画の陽性率および分画比の値を病期別、組織型別にみると、病期の進行にともなって陽性率は上昇し、また分画比は有意差をもって上昇した。組織型別にみると扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌の順に陽性率および分画比が高い値を示したが、それらの間に有意差は認められなかった(表1)。分子量が既知の5種類の精製標準蛋白を既掲の条件でHPLCにかけたときのRTより相関式が求められ、私どもの注目しているRT34 分画の分子量を推算すると、この分画は分子量が6,000から8,000の間の物質からなっていることがわかった。

さらに悪性腫瘍患者について、それらのRT34 分画比が①6以下、②6~10、③10以上の3群に分け、CEA, TPA, PHA, ConAの値を検討した。CEA, TPAの検討では、3群間において有意差は認められなかったが、PHAのSI値では①群が $363.5 \pm 165.1$ 、②群が $131.9 \pm 68.5$ 、③群が $92.2 \pm 70.2$ の値を示し、①群に比べて②・③群が有意に低値を示し

表1 肺癌の病期別・組織別陽性率及びRT34 分画比

	陽 性 率	RT34 分画比	
stage I	9/20 (45%)	$6.17 \pm 3.00$	* ** ***
stage II	3/6 (50%)	$6.28 \pm 2.76$	
stage III	16/20 (65%)	$7.84 \pm 4.64$	
stage IV	21/27 (77%)	$10.44 \pm 5.67$	
腺 癌	20/33 (60%)	$8.45 \pm 2.80$	
扁平上皮癌	16/22 (72%)	$10.06 \pm 5.54$	
小細胞癌	2/4 (50%)	$8.05 \pm 0.24$	

\*  $p < 0.1$   
 \*\*  $p < 0.1$   
 \*\*\*  $p < 0.01$

た( $p < 0.01$ )。ConAにしても同様の結果を得た(図2)。

## II. 肺癌患者の気管支洗浄液中蛋白の分析

患側気管支と対側気管支のそれぞれとから採取した洗浄液について、血清と同様に比較検討したところ、患側気管支から採取した洗浄液のRT34 分画比は $6.53 \pm 4.81$ 、対側気管支から採取したものは $2.28 \pm 2.85$ と、患側において有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。

## B) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法

上記のRT34 分画抽出精製し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法にて分析した後、銀染色を行うと、分子量1万以下の領域に銀染色により染色されるバンドが認められた。

## 考 察

癌患者の血清蛋白分画は、健常人の蛋白分画と異なることが注目され、Snyderら<sup>4)</sup>は、癌患者において、hemopexin,  $\alpha_1$  acid glycoprotein,  $\alpha_1$  anti-trypsinの増量を報告した。同様に、Macbeth<sup>5)</sup>, Harvey<sup>6)</sup>が、上記蛋白を含め、急性相蛋白と総称される血清糖蛋白の数種が担癌症例において上昇することを報告している。当教室においても、龍村ら<sup>2)</sup>が糖蛋白分画中のfucoseが担癌生体において有意

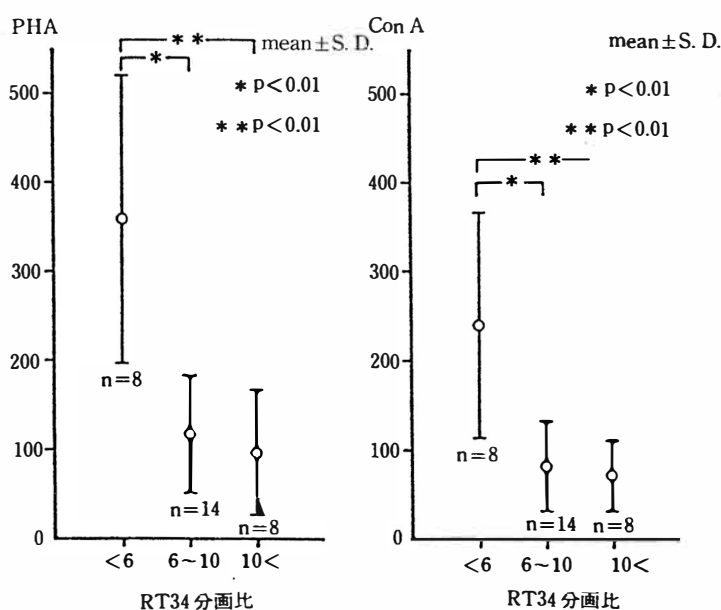


図2 RT34 分画比別の PHA, Con A の比較

に上昇することを他に先駆けて報告している。この一連の研究の継続として、さらに村上<sup>7)</sup>は癌、及び非癌者の血清蛋白分画を HPLC 法 (カラム TSK-gelG3000sw) をもちいて測定し、担癌患者血清中の分子量 1 万前後と推定される分画に興味深い結果をえた。そこで今回、TSKgelG3000sw カラムよりも至適分子量が低く、村上の注目した分画のレベルに適した TSKgelG2000sw カラムを用いてさらに検討した。

今回の検討では、癌患者血清中の RT34 分の分画が有意に上昇し、しかも癌の進行にともなって上昇することを知り得た。また、cut off 値を設定することにより、その陽性率が癌患者で有意に高いことを示した。ゆえにこの RT34 分画が癌血清診断上有用なパラメーターになり得ると考えた。また、吸光度及び銀染色により高分子ポリペプチド、ないし蛋白質と考えられる本分画の分子量は 6000~8000 と推算された。

銀染色法は、従来より繁用されているクーマシーブリリアントブルー染色法の 50~100 倍の感度を有する染色法であるが、SDS-PAGE により RT34 分画は血清では捉えられず、RT34 分画の抽出物でようやくバンドとして捉えることができた。これは HPLC 法の検出能の優秀性を裏付けている。

ところで癌患者血清における血清蛋白の変動の機序として、松本<sup>8)</sup>は、癌細胞から放出される hepatocyte stimulating factor により、肝細胞における急性相蛋白の産生が増加した結果であろうと報告している。しかし、癌細胞からある種の蛋白が産生されている可能性を示す報告もある<sup>9)</sup>。実際、細胞膜糖蛋白、および糖脂質の性状は、細胞の癌化や発生・分化に伴って変化するといわれるが<sup>10,11)</sup>、一般に癌化に際して、細胞膜糖蛋白の糖含量の増加、N-グリコシド型糖鎖の分岐の増大、および O-グリコシド型糖蛋白の出現が知られている<sup>12)</sup>。

一方、最近では血清のみならず、諸他の体液、例えば肺癌患者の場合、その気管支洗浄液なども生化学的診断に利用されている。Iglehart ら<sup>13)</sup>は、気管支洗浄

液中の immunoglobulin A が、肺癌において有意に上昇することを指摘し、肺癌の診断に有用であると報告している。また、洗浄液中の CEA に関する報告もあり<sup>14-16)</sup>、藤井らは、洗浄液中 CEA の高値は肺癌組織の局所産生 CEA を反映したものであり、その測定が末梢型肺癌の鑑別診断に有用であると報告している。私どもが行った気管支洗浄液中の RT34 分画の検討では、患側気管支において RT34 分画比が高値を示し、この RT34 分画が腫瘍細胞、もしくはその周辺より産生されている可能性が示唆された。しかしこの場合、検体の採取方法、つまり洗浄液の量、洗浄気管支の選択、患者の呼吸状態による洗浄範囲の適否、気管支内腔への腫瘍の進展の程度といった問題もあり、今後さらに検討究明すべき課題も残されている。

さらに近年、担癌患者の血清蛋白組成の変化と癌に対する免疫機構との関連も注目されてきている。従来、癌患者の血清が免疫抑制活性を示すことは知られており、こうした免疫抑制の因子として癌患者血清中に増量する或種の蛋白が考えられている。それについて Cooperband ら<sup>17)</sup>は  $\alpha$ -globulin 中より免疫抑制因子を抽出し、immunoregulatory  $\alpha$ -globulin (IRA) と名付け、また、宮地<sup>18)</sup>は担癌生体において PHA によるリンパ球幼若化能を測定し、 $\alpha_1$

acid glycoprotein,  $\alpha_1$  antitrypsin との間に逆相関があることを立証している。私どもの検討でも RT34 分画の上昇にともなって、PHA・ConA の細胞性免疫の指標が低下することが示され、RT34 分画が免疫抑制に関与している可能性が示唆され、この分画は急性相蛋白に類縁の性質をもつ物質であろうと考えている。しかし、このような免疫機作に関与する物質としては、RT34 分画のような低分子量のものはまだ報告されておらず、私どもが得た新しい知見の一つである。

## 総 括

HPLC (カラム TSKgelG2000sw) で、retention time 34 分に得られた低分子量物質(推定分子量6000~8000)は、現在までに腫瘍マーカーとして見いだされている CEA や AFP, および急性相反応蛋白と総称される血清糖蛋白とはかなり異なる新しい血清中の蛋白分画として注目すべきものと考えられる。さらに、RT34 分画は、腫瘍免疫機作にも関わりを持つ癌関連物質であることが推測され、HPLC 法によるその測定は癌血清診断上パラメーターとして有用であることが示された。今後さらに研究を継続し、この低分子量の蛋白分画の本質を明らかにしていきたい。

## 文 献

- 1) Lambana S. : Clinical value of protein-blood fucose in patients with carcinoma and other diseases. *Gann* **67** : 379-388, 1976.
- 2) Tatsumura T., Sato H., Komori Y., and Yamamoto K. et al. : Clinical significance of fucose level in glycoprotein fraction of serum in patients with malignant tumors. *Cancer Res.* **37** : 4101-4103, 1977.
- 3) Merrill C. R., Goldman D. and Sedman S. A. et al. : Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211** : 1437-1438, 1981.
- 4) Synder S. and Ashwell G. : Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy. *Clin. Chem. Acta.* **34** : 449-455, 1971.
- 5) Macbeth R. A. L. and Bekesi J. G. : Plasma glycoproteins in various disease states including carcinoma. *Cancer Res.* **22** : 1170-1176, 1962.
- 6) Harvey H. A., Lipton, A. and White D. et al. : Glycoproteins and human cancer. *Cancer* **47** : 324-327, 1981.
- 7) 村上 新, 龍村俊樹, 清水岑雄ほか: 担癌生体における血清蛋白分画の異同に関する研究——高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography)を用いたヒト血清蛋白の分析とその意義——. *金大十全医誌* **96** : 575-586, 1987.
- 8) 松本雅彦, 勝沼恒彦: インターロイキン I と肝細胞刺激因子 (HSF). *日本臨床* **45** : 1032-1039, 1987.
- 9) 吉村真一, 上山義人, 秦 順一ほか: 担癌マウス血清中に検出される人血清蛋白成分. *日癌会36回総会記* **848** : 1977.
- 10) Tatsumura T., Ariga T. and Alan C. Sartorelli et al. : Changes in glycosphingolipids accompanying the differentiation of human squamous SQCC/Y1 cells. *Cancer Res.* **48** : 2121-2124, 1988.
- 11) Hakomori S. : Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **50** : 733-764, 1981.
- 12) 小島清秀: がん細胞の膜生化学. *日本臨床* **43** : 794-798, 1985.
- 13) Iglehart J. D., Warzynski M. J. S. and Monteraro R. C. et al. : Function of the secretory immune system in bronchogenic carcinoma. Immunoglobulin A levels in respiratory secretions. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **82** : 63-69, 1981.
- 14) Lemarie C., Lavandier M., and Renoux M. and Renoux G. : Carcinoembryonic antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *N. Engl. J. Med.* **303** : 586, 1980.
- 15) 白木るい子, 木下美登里, 和顔房代ほか: 肺癌



- 患者における気管支肺胞洗浄液中 CEA 値の検討. 日胸疾会誌 **20** : 398-402, 1982.
- 16) 藤井昌史, 木浦勝行, 亀井治人ほか: 末梢型肺癌における気管支肺胞洗浄液中 CEA, SCC, NSE の検討. 日胸会誌 **27** : 452-455, 1989.
- 17) Cooperband S. R., Badger A. M. and Davis R.C. et al. : The effect of immunoregulatory alpha globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. J. Immunol. **109** : 154-163, 1972.
- 18) 宮地洋二: 癌手術適応決定のための免疫学的指標に関する研究. 名市大医誌 **28** : 554-584, 1977.

## 乳癌における癌遺伝子産物の免疫組織学的検討

## ——c-erbB-2 product を中心に——

田 内 克 典\*, 長 村 義 之\*\*, 藤 巻 雅 夫\*

富山医科薬科大学外科学第2教室\*, 東海大学病理学教室\*\*

## はじめに

近年、乳癌において癌遺伝子と予後因子との関連が注目されているが、未だ統一した見解はえられていない<sup>1-4)</sup>。その手法も核酸レベルで癌遺伝子の増

幅, mutation を検出する方法と癌遺伝子産物を検出する方法に大別されている。我々は、新鮮凍結切片を用いて c-erbB-2 product, epidermal growth factor receptor(EGFR), c-myc protein, estrogen receptor(ER) の免疫組織学的検討を行い既に報告し

Table 1. Details of the cases and immunohistochemistry of breast cancers

Case	Age	Histology	Grade <sup>1</sup>	Size(cm)	LN meta	c-erbB-2	EGFR	c-myc	ER
1	43	S-T <sup>2</sup>	III	3.5x3.5	0/5	++	-	+++	+++
2	53	Sci <sup>3</sup>	II	3.5x2.5	2/20	+++	-	+++	-
3	56	S-T	II	5.0x4.5	0/22	-	-	+++	-
4	70	Sci	I	1.5x1.5	0/16	+/-	-	++++	+++
5	33	SQ <sup>4</sup>	III	1.6x1.2	1/21	+++	+++	+/-	-
6	67	Sci	I	1.5x1.2	0/18	+	-	+++	+++
7	72	Muc <sup>5</sup>	I	2.0x2.0	0/22	+	+	-	+++
8	48	S-T	II	5.5x5.0	44/48	+++	+++	+++	-
9	43	Sci	I	4.5x3.5	10/17	++++	-	+++	++
10	49	S-T	I	2.0x2.0	1/14	+++	-	+++	+++
11	51	S-T	II	5.0x4.0	0/40	+/-	+++	+	++
12	72	Sci	I	6.0x5.0	0/25	+	-	+++	++
13	43	Sci	III	4.2x3.2	2/17	-	+++	++	-
14	47	S-T	I	1.5x1.0	0/4	++	-	+++	+++
15	43	Sci	I	1.5x1.5	0/10	+	+	+	+++
16	47	Sci	II	1.5x1.0	1/12	+	-	+++	-
17	44	S-T	II	3.0x3.2	2/13	++	-	+++	+++
18	50	P-T <sup>6</sup>	I	3.9x3.5	5/17	+	+++	+++	+
19	61	S-T	III	8.0x7.0	11/25	++++	+++	+++	-
20	89	Sci	II	3.0x2.7	1/14	+	-	+++	++
21	44	Sci	I	2.0x2.0	0/11	+	-	++++	+
22	44	Sci	II	4.0x2.0	1/10	+/-	-	+++	+
23	49	Sci	II	1.6x1.8	0/11	+	+	+++	+
24	33	P-T	III	1.7x0.5	1/21	+++	++	+++	-
25	68	Sci	III	2.0x2.5	4/12	+/-	-	+++	+++

<sup>1</sup> : Histological grade was determined using a modification of Bloom and Richardson's method (Elston et al. 1982) <sup>2</sup> : Solid-Tubular Carcinoma <sup>3</sup> : Scirrhus Carcinoma <sup>4</sup> : Squamous Cell Carcinoma <sup>5</sup> : Mucinous Carcinoma <sup>6</sup> : Papillotubular Carcinoma - : negative ; +/- : 1%~5 % positive ; + : 5%~25% positive ; ++ : 25%~50% positive ; +++ : 50%~75% positive ; ++++ : more than 75% positive

Table 2. Details of the antibodies used in fresh frozen tissues

Antibody	Source	Dilution	Fixation	Method
c-myc (OM-11-906)	Cambridge Research Biochemicals	1 : 100	10% formalin	indirect <sup>1</sup>
EGFR (RPN513)	Amersham	1 : 50	100% acetone	indirect
c-erbB-2 (pAb1)	Triton Biosciences Inc	1 : 10	10% formalin	indirect
ER	Abbott Laboratories	kit	10% phosphate buffered formalin	PAP <sup>2</sup>

<sup>1</sup> : indirect immunoperoxidase method

<sup>2</sup> : peroxidase-antiperoxidase method

ているが<sup>5)</sup>, 加えて c-erbB-2 product の長期予後因子としての意義につき検討した。

month について検討した。

## 結 果

### 材料および方法

- 1 新鮮凍結切片を用いた検討：対象は手術的に切除された25例で、症例の要約を Table 1 に示す。使用した抗体、固定法及び染色法を Table 2 に示す。組織学的悪性度はElston ら<sup>6)</sup>による方法を使用した。
- 2 新鮮凍結切片とパラフィン切片の比較：対象は手術的に切除された57例で、方法は Table 3 に示す。
- 3 長期予後因子としての検討：初回手術後10年経過した40例ではパラフィン切片を用いた c-erbB-2 product の染色性と手術時リンパ節転移の有無及び予後について、腫瘍摘出術並びに剖検の行われた16例については同様にして組織型、病期、術式、再発形式、disease free month, overall survival

新鮮凍結切片を用いた oncogene products 及び ER の染色結果を Table 1 に示す。それぞれの陽性率は c-erbB-2 80%, EGFR 40%, c-myc 96%, ER 28%で EGFR と ER の染色性について逆相関が認められた ( $p < 0.05$ )。手術時リンパ節転移陽性の14例と転移陰性の11例の比較では、c-erbB-2 の陽性率において有意の相関を認め ( $p < 0.05$ )、c-erbB-2 強陽性 (+++ あるいは +++) 例の7例 (28.0%) は全例リンパ節転移陽性であった。その他の因子の検討では、組織学的悪性度と ER の染色性で相関を認めた ( $p < 0.05$ ) 他、有意な関連は認められなかった。

c-erbB-2 product の新鮮凍結切片とパラフィン切片の陽性例の比較では、新鮮凍結切片では42例 (73.7%) うち強陽性18例 (31.6%), パラフィン切片で

Table 3. Method of immunohistochemistry used in fresh frozen and paraffin-embedded tissues

Specimens	Fixation	Incubation	Dilution	Method
Fresh frozen	10% formalin	room temperature 30 minutes	1 : 10	indirect immunoperoxidase
Paraffin-embedded	10% formalin	4°C overnight	1 : 100	indirect immunoperoxidase

1st antibody : c-erbB-2(pAb1), (Triton Biosciences Inc)

2nd antibody : donkey anti-rabbit Ig, 1 : 100 (Amersham)

は10例(17.5%)であり、パラフィン切片陽性例は全例新鮮凍結切片強陽性例であった(Table 4)。新鮮凍結切片で強陽性を示した18例中13例(72.2%)、パラフィン切片陽性例10例中 8例(80.0%)に手術時リンパ節転移を認めたが、手術時リンパ節転移陽性の20例からみると新鮮凍結切片での強陽性例は13例(65.0%)であったが、パラフィン切片陽性例は 8例(40.0%)と低率であった。

術後10年経過40例のパラフィン切片を用いた検討では、手術時リンパ節転移陽性例22例中 8例(36.3%)が、リンパ節転移陰性18例中 1例(5.6%)が陽性であったが、生存例と死亡例の間では陽性率に有意差は認められなかった。剖検例16例の検討では、陽性例を示したのは4例で、陽性例中 3例に手術時リンパ節転移を認め、手術時リンパ節転移陰性の1例もリンパ節転移を主徴として再発していた。disease free 及び overall survival month はそれぞれ、陽性群 $14.3 \pm 10.1$ ,  $24.8 \pm 18.7$  陰性群 $16.5 \pm 12.2$ ,  $37.0 \pm 29.0$  で両群の間に有意な差は認められな

ったが(Table 5), stage 4 の3例を除いた overall survival month では、陽性群 $24.8 \pm 18.7$ , 陰性群 $47.0 \pm 26.7$  で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

## 考 察

乳癌における癌遺伝子産物の免疫組織学的検出と予後因子との関連については近年多くの報告を認め、特に *neu oncogene*<sup>7)</sup> としても知られている分子量185kDa のチロシンキナーゼ活性を有する *trans-membrane glycoprotein* である *c-erbB-2 product*<sup>8-10)</sup> は独立した予後因子として注目されているが<sup>2-4)</sup>, 予後因子として重要と思われるリンパ節転移と *c-erbB-2 product* との関連については、未だ一致をみないのが現状である。我々の新鮮凍結切片を用いた検討では、*c-erbB-2 product* の免疫組織化学とリンパ節転移の有無とに相関を認めたが、腫瘍の大きさと相関があるとされている EGFR や、腫瘍の増殖能と関連が示唆されている *c-myc protein* では、予

Table 4. Immunohistochemistry for *c-erbB-2* in node positive cases

Case	Age	Histology	Size(cm)	LN meta	fresh	paraffin
1	53	Sci <sup>1</sup>	3.5x2.5	2/20	+++	+
2	33	SQ <sup>2</sup>	1.6x1.2	1/21	+++	+
3	48	S-T <sup>3</sup>	5.5x5.0	44/48	+++	++
4	43	Sci	4.5x4.3	10/17	++++	+
5	49	S-T	2.0x2.0	1/14	+++	-
6	43	Sci	4.2x3.2	2/17	-	-
7	47	Sci	1.5x1.0	1/12	+	-
8	44	S-T	3.0x3.2	2/13	++	-
9	50	P-T <sup>4</sup>	3.9x3.5	5/17	+	-
10	61	S-T	8.0x7.0	11/25	++++	++
11	89	Sci	3.0x2.7	1/14	+	-
12	44	Sci	4.0x2.0	1/10	-	-
13	33	P-T	1.7x0.5	1/21	+++	-
14	68	Sci	2.0x2.5	4/12	-	-
15	46	P-T	3.0x2.5	4/30	+++	-
16	39	S-T	3.0x2.5	2/33	+++	+
17	32	S-T	4.0x4.0	3/25	+++	+
18	51	Med <sup>5</sup>	7.0x7.0	2/15	+++	-
19	36	S-T	3.8x3.8	4/9	+++	-
20	47	P-T	10.0x10.0	36/36	+++	+

<sup>1</sup>: Scirrhus Carcinoma <sup>2</sup>: Squamous Cell Carcinoma

<sup>3</sup>: Solid-Tubular Carcinoma <sup>4</sup>: Papillotubular Carcinoma

<sup>5</sup>: Medullary Carcinoma

Table 5. Details of the cases and immunohistochemistry for *c-erbB-2* in autopsy cases

Case	Age	Histology	Stage	Operation	Recurrence	Free <sup>1</sup>	Overall <sup>2</sup>	<i>c-erbB-2</i>
1	45	P-T <sup>3</sup>	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , III	Extended	Local	4	13	++
2	69	S-T <sup>4</sup>	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> , II	Standard	Bone	7	20	-
3	53	S-T	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , II	Extended	Liver	17	18	-
4	45	Med <sup>5</sup>	T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , III	Extended	Bone	7	10	-
5	41	S-T	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub> , IV	Standard			3	-
6	34	S-T	T <sub>2</sub> N <sub>3</sub> M <sub>0</sub> , III	Extended	Bone	11	16	++
7	58	S-T	T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub> , IV	Standard			14	-
8	32	Med	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub> , IV	Simple			4	-
9	52	S-T	T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub> , III	Extended	Bone	30	37	-
10	32	P-T	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> , II	Standard	Lymph node	31	57	+
11	43	S-T	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , III	Standard	Local	34	51	-
12	54	S-T	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , II	Extended	Local	27	74	-
13	32	Sci <sup>6</sup>	T <sub>3</sub> N <sub>3</sub> M <sub>0</sub> , III	Modified	Bone	28	53	-
14	49	S-T	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub> , III	Standard	Local	27	66	-
15	29	S-T	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , II	Modified	Ovary, Bone	11	13	+++
16	72	S-T	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> , II	Standard	Pleura	19	94	-

<sup>1</sup>: Disease free month, <sup>2</sup>: Overall survival month, <sup>3</sup>: Papillotubular Carcinoma

<sup>4</sup>: Solid-Tubular Carcinoma, <sup>5</sup>: Medullary Carcinoma, <sup>6</sup>: Scirrhous Carcinoma

後因子としての相関は認められなかった<sup>5)</sup>。乳癌の外科的治療は、従来の拡大切除術を中心とした術式から、より侵襲の少ない縮小手術が首座を占めようとしており、外科医にとって術式や術後化学療法選択のうえで、術前にリンパ節転移の状態を把握することは以前にも増して重要となってきた。我々の検討では、腫瘍径 2.0cm未満でリンパ節転移を認めた3症例全例が *c-erbB-2* 陽性を示し、2例は強陽性であり、従来術前に診断が困難であったリンパ節転移の予測についても *c-erbB-2* product の有用性が示唆されている。*c-erbB-2* product の新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学は、gene amplification の検出に比較して短時間で比較的簡単に行え、細胞診にも応用が可能であり、従来行われてきた組織学的悪性度の検討や estrogen receptor の状態に加え、腫瘍の biological behavior を予測する上で重要な意味を持つものと期待される。

*c-erbB-2* product の免疫組織化学の新鮮凍結切片とパラフィン切片との陽性率の比較では、新鮮凍結切片では42/57 (73.7%)、うち強陽性18/57 (31.6%)、パラフィン切片では10/57(17.5%)であり、新鮮凍結切片での良好な抗原性の保存が証明された。新鮮凍結切片で強陽性を示した18例中13例(72.2%)、

パラフィン切片陽性10例中8例(30.0%)に手術時リンパ節転移を認め、*c-erbB-2* product の免疫組織化学とリンパ節転移との相関が示唆されたが、手術時リンパ節転移陽性の20例よりみると、新鮮凍結切片での強陽性例は13例(65.0%)であったが、パラフィン切片陽性例は8例(40.0%)と低率であり、今回用いた抗体では *c-erbB-2* の免疫組織化学とリンパ節転移の相関は新鮮凍結切片での比較が望ましいと思われた。

*c-erbB-2* の免疫組織化学と術後10年経過例の予後検討では、明かな関連は認められなかった。剖検例16例の検討では、Stage IV の3例全例が *c-erbB-2* 陰性であったことより、*c-erbB-2* product の over-expression は必ずしも乳癌の進行度を表してはいないと思われたが、Stage IV の3例を除いて *c-erbB-2* 陽性群と陰性群の間に overall survival の期間に有意差を認めたことより *c-erbB-2* の免疫組織化学は長期予後因子たる可能性を示唆した。

## 文 献

- 1) Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G. et al. : Human breast cancer : correlation of

- relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science* **235** : 177–182, 1987.
- 2) Berger M. S., Locher Q. W., Saurer S. et al. : Correlation of *c-erbB-2* gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* **48** : 1238–1243, 1988.
- 3) Van de Vijver M. J., Peterse J. L., Mooi W. J. et al. : *Neu*-protein overexpression in breast cancer : association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognosis value in stage II breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **319** : 1239–1245, 1988.
- 4) Wright C., Angus B., Nicholson S. et al. : Expression of *c-erbB-2* oncoprotein : a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* **49** : 2087–2090, 1989.
- 5) Tauchi K., Hori S., Osamura R. Y. et al. : Immunohistochemical studies on oncogene products (*c-erbB-2*, EGFR, *c-myc*) and estrogen receptor in benign and malignant breast lesions : with special reference to their prognostic significance in carcinoma. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* **416** : 65–73, 1989.
- 6) Elston C. W., Gresham G. A., Rao G. S. et al. : The cancer research campaign (King's/Cambridge). Trial for early breast cancer : Clinico-pathological aspects. *Br. J. Cancer*, **45** : 655–669, 1982.
- 7) Schechter A. L., Stern D. F., Vaidyanathan L. et al. : The *neu* oncogene : an *erbB*-related gene encoding a 185000-Mr tumor antigen. *Nature* **312** : 513–516, 1984.
- 8) Semba K., Kamata N., Toyoshima K. et al. : A *v-erbB*-related protooncogene, *c-erbB-2*, is distinct from the *c-erbB-1*/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 6497–6501, 1985.
- 9) Coussens L., Yang-Feng T. L., Liao Y. C. et al. : Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* **230** : 1132–1139, 1985.
- 10) Akiyama T., Sudo C., Ogawara H. et al. : The product of the human *c-erbB-2* gene : a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* **232** : 1644–1646, 1986.

## 肺癌における 5 種腫瘍マーカー測定の意義

水 島 豊

富山医科薬科大学内科学第 1 教室

### はじめに

近年各種腫瘍マーカーが開発され、癌の補助診断や臨床経過のモニタリングに用いられている。著者らは以前より肺癌患者血清中の腫瘍マーカーを測定し、その有用性について検討してきた<sup>1-4)</sup>。今回肺癌における 5 種腫瘍マーカー測定の意味について報告する。

### 対 象 と 方 法

原発性肺癌患者 (LC 群) 116 名, 良性呼吸器疾患患者 (B 群) 148 名, 転移性肺癌患者 32 名および健康人 (H 群) 41 名を対象とした。LC 群の組織型は扁平上皮癌 (Sq) 36 名, 腺癌 (Ad) 48 名, 小細胞癌 (Sm) 29 名, および大細胞癌 (La) 3 名で, 病期は I 期 9

名, II 期 6 名, III 期 34 名および IV 期 67 名である。測定した腫瘍マーカーは, CA19-9, CEA, NSE, SCC および TPA で, 原則として未治療時に測定した値を用いた。cut off 値はそれぞれ 40U/ml, 2.5ng/ml, 10ng/ml, 2.0ng/ml および 120U/l とした。

### 成 績

1. 各腫瘍マーカーの特異性, 感度および正診率について

各腫瘍マーカーの H 群, B 群および LC 群での陽性率を Table 1 に示した。H 群, B 群での陽性率はそれぞれ 0~7.3%, 5.4~12% であり, 各マーカーの特異性は 88~94% であった。LC 群での陽性率は, 28~66% と SCC で最も低く TPA で最も高かった。正診率は, 63~81% であった。5 種マーカー全てに

Table 1. Positive rate of each tumor marker in H, B and LC groups

Tumor marker	H (n=41)	B (n=148)	LC (n=116)	Accuracy <sup>a</sup>
CA19-9	7.3% (50) <sup>b)</sup>	12% (119)	32% <sup>c)</sup> (1774)	63%
CEA	2.4% (2.7)	8.8% (4.1)	53% <sup>c)</sup> (110.2)	74%
NSE	0	5.4% (11.9)	35% <sup>c)</sup> (50.5)	64%
SCC	2.4% (2.1)	8.1% (2.7)	28% <sup>c)</sup> (4.3)	64%
TPA	2.4% (152)	8.1% (252)	66% <sup>c)</sup> (522)	81%

a) Accuracy (%) =  $\frac{\text{No. of true positive} + \text{No. of true negative}}{\text{B} + \text{LC (n=264)}} \times 100$

b) Parenthesis = mean value for those presenting positive marker levels.

c)  $p < 0.005$  vs. B group.

Table 2. Number of positive tumor markers in B and LC groups

No. of positive markers	B (n=148)	LC (n=116)	Histologic type				Relative <sup>a)</sup> possibility
			Sq (36)	Ad (48)	Sm (29)	La (3)	
0	64%	16%	14%	19%	14%	0%	20%
1	29	12	22	10	3.4	0	29
2	4.7	34	36	27	41	33	88
3	1.4	22	11	33	34	33	94
4	0	15	14	21	3.4	33	100
5	0	1.7	2.8	0	3.4	0	100
2 ≤	6.1%	72%	64%	71%	83%	100%	

$$a) \text{ Relative possibility of lung cancer (\%)} = \frac{\text{LC (\%)}}{\text{B (\%)} + \text{LC (\%)}} \times 100$$

において、LC 群の陽性率はB群のそれに比し有意に高率であった。

## 2. 各腫瘍マーカーの組織型別陽性率

CA19-9 と CEA は Ad で、NSE は Sm で、SCC は Sq で最も高い陽性率を示した。TPA はいずれの組織型でも高い陽性率を示した。

## 3. 5 種腫瘍マーカー測定における陽性マーカー数の意義

複数腫瘍マーカーを組み合わせる combination assay の長所は、肺癌での陽性率の増加であり（感度の向上）、逆に欠点は良性疾患での陽性率の増加（特異性の低下）である。そこでこの欠点を補うことを目的に、陽性腫瘍マーカー数の意義について検討した。Table 2 に示すように、5 種のうち 1 個のみ陽性を示した場合の肺癌である可能性は29%と低いが、2 個以上ではその可能性が 88~100%と高率となることが明らかとなった。病期別に 2 個以上が陽性となる率をみると、I 期44%(4/9)、II 期50%(3/6)、III 期65%(22/34) および VI 期81%(54/67) と病期が進むにつれ高率となった。早い病期でも比較的高い率を示し、陽性数を考慮することが combination assay を用いた補助診断上有用と思われた。

## 4. 原発性肺癌と転移性肺癌の腫瘍マーカー陽性率の比較

原発性と転移性肺癌の間で腫瘍マーカー上何か差異が認められるか否かを検討した。全組織型で検討

すると各マーカー陽性率に両者間で有意差は認められず、原発性か転移性かの鑑別は、腫瘍マーカーではなし得ないと思われた。ただ Stage IV の原発性肺腺癌と転移性腺癌の間では、CEA の陽性率に有意差がみとめられた (86% vs 40%)。

## 5. 治療経過のモニタリングにおける 5 種腫瘍マーカー測定の意義

67才男性（肺小細胞癌、Stage IV）の入院経過中の各腫瘍マーカーの動きを Fig. 1 に示した。入院時の各マーカーの値は CA19-9 = 36U/ml, CEA = 8.2 ng/ml, NSE = 24ng/ml, SCC = 1.1ng/ml および TPA = 179U/l であった。5 月29日の CY + VCR + VP - 16 の化学療法により NSE, TPA 値は正常化し、かつ自・他覚的症狀も改善した。しかし CEA 値の低下は認められなかった。6 月26日同じ regimen で治療したがやはり CEA 値は低下傾向を示さず、胸部 X-P 上の改善も進まなかった。そこで放射線療法を開始し、7 月27日新しい regimen CDDP + THP - ADR で治療したところ、CEA 値は正常化した。CA19-9, TPA は一過性に高値を示したがその後正常化し、胸部 X-P 上完全寛解となった。以後患者は退院し外来 follow となった。

## 考 察

今回の study において、以下の 2 点を強調したい。



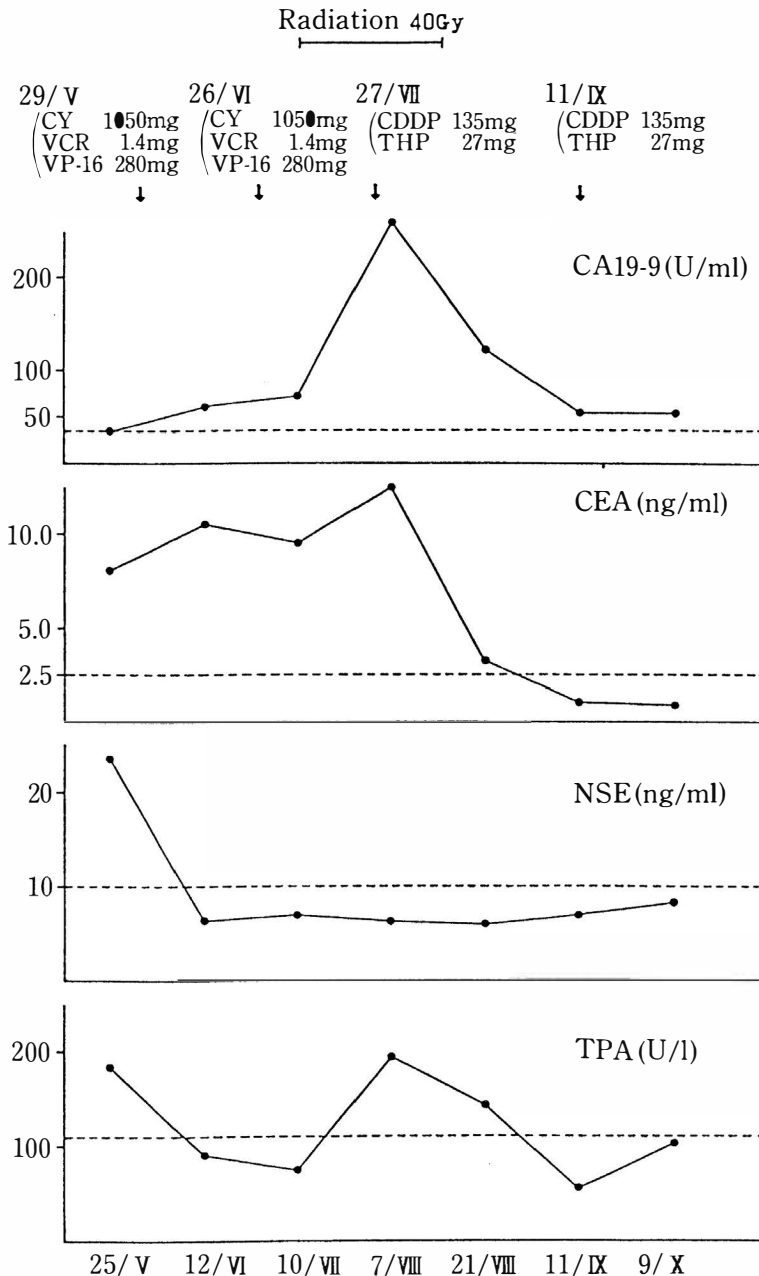


Fig. 1 入院経過中の各腫瘍マーカーの動き

第1点は、5種腫瘍マーカーを測定し肺癌の補助診断を行う場合、腫瘍マーカー陽性数が有用であること、第2点は、治療により各腫瘍マーカーが独立して動く case があり、各マーカーの動きを総合して治療効果を判定することが大切である、の2点である。特に第2点は留意すべきと思われる。癌は heterogeneous な population から成っており、薬剤に対

する感受性も異なることが知られている。今回示した症例では、CY + VCR + VP-16 の regimen は NSE や TPA 陽性 population に対しては感受性を示したが、CEA 陽性 population に対しては非感受性であったと推察される。regimen を CDDP + THP - ADR に変えることにより CEA 陽性 population が障害され完全寛解に入ったと思われる。

肺癌は他の臓器と異なり Sq, Ad, Sm, La 等といった複数の組織型を有していることが特徴である。よって、いくつかの腫瘍マーカーを組み合わせる combination assay は、癌の補助診断や治療経過のモニタリング上有用であると思われる。現在、腺癌に高い陽性率を示す腫瘍マーカーは比較的多いが、扁平上皮癌に対して感度の高いマーカーは少ない。胸部 X-P では見つけることの困難な肺門型扁平上皮肺癌に対し、感度の優れた腫瘍マーカーの出現することを期待したい。

## 文 献

- 1) 水島 豊, 中村 文, 横山彰仁ほか: 悪性腫瘍の補助診断における TPA の有用性. 癌の臨床 **32**: 779-782, 1986.
- 2) 水島 豊, 森蔭俊彦, 沢崎茂樹ほか: 肺癌診断における CEA, TPA combination assay の有用性. 日胸 **46**: 198-202, 1987.
- 3) 水島 豊, 平田 仁, 泉 三郎ほか: 肺癌における各腫瘍マーカーの補助診断的有用性と併用測定の意義について. 肺癌 **27**: 739-743, 1987.
- 4) Mizushima Y., Hirata H., Izumi S. et al.: Clinical significance of the number of positive tumor markers in assisting the diagnosis of lung cancer with multiple tumor marker assay. Oncology **87**: 43-48, 1990.

# 多変量解析システムの膵臓癌診断への応用

斎 藤 清 二

富山医科薬科大学内科学第3教室

## はじめに

膵臓疾患は最も診断法の進歩が遅れていた領域であるが、近年画像診断の進歩、新しい腫瘍マーカーの開発などにより、膵臓癌の診断法は急速に進歩しつつある。特に近年、CA19-9をはじめとする多数の腫瘍マーカーが開発され、臨床に応用されている。しかしながら、現実には単独の腫瘍マーカーの診断能には明らかに限界がある。そこで複数の腫瘍マーカーをコンビネーションで測定することにより、診断能を向上させようという試みがなされて来た。しかし複数の項目を測定すれば、感度 (sensitivity) は増加するが、特異性 (specificity) は低下し、多数の偽陽性例を生み出すことになる。今回我々は、腫瘍マーカーのコンビネーションアッセイに多変量パターン解析システム (Computer Aided Multivariate Pattern Analysis System : 以下 CAMPAS) を応用し、感度を低下させることなく特異性を最大限に引き上げ、膵臓癌と膵胆道の良性疾患を高い確率で判別できる診断システムを開発することを目的に検討を行った。

## 対 象 と 方 法

1. 対象：今回のモデル作成に用いた対象症例は、本学第3内科および関連病院、県立ガンセンター新潟病院内科で経験された、膵臓癌32例、良性膵胆道疾患32例である。膵臓癌症例は全例、典型的な画像診断所見を呈し、手術、剖検、生検、または細胞診により、診断が確定されている。ただし、巨細胞癌、粘液産生腫瘍などの特殊な組織型のものは除外した。腫瘍マーカーを測定した時期の推定ステージは、IIが3例、IIIが4例、IVが25例と進行例が圧倒的に多く、ステージIは1例も認めなかった。占拠部位は頭部が23例、体尾部が9例であった。またサンプル

採取時期のCT、USなどの画像診断から推定した腫瘍の最大径は4cm未満のもの15例、4cmを超えるもの17例であった。良性疾患の内訳は、日本膵臓学会の診断基準を満たす慢性膵炎I群10例、II群4例の計14例、および総胆管結石症6例、胆嚢結石症12例の胆道系結石18例であった。

2. サンプルの採取と測定。血液サンプルは、入院時または診断確定時に採取し、すべて治療開始以前のものとした。早朝空腹時に15mlを通常の方法で採血し、血清を分離後-20℃に保存し、1週間以内に測定した。測定した腫瘍マーカーは表1に示す17項目で、各々の測定法は表1に示したとおりである。

表1 測定項目

検査項目	基準値	測定法
CA19-9	37U/ml	RIA 固相法
CA125	35U/ml	RIA 固相法
DUPAN2	150U/l	EIA
CA 50	35U/ml	TR-FIA
CEA(S)	2.5ng/ml	RIA 固相法
Ferritin	250ng/ml	RIA2 抗体法
TPA	110U/l	RIA 固相法
IAP	500ng/ml	TIA
EL-1	400ng/ml	RIA2 抗体法
Trypsin	460ng/ml	RIA2 抗体法
Lipase	55U/l	UV-Rate assay
Amylase	200U/l	酵素法
PSTI	14.7ng/ml	RIA2 抗体法
γ-GTP	45U/l	Rate assay
ALP	220U/l	PNP-Rate assay
LDH	360U/l	UV 法
CRP	350ng/ml	Laser nephro●metry

## 3. 鑑別モデル作成のための統計学的検討

1) 膵癌の腫瘍径と腫瘍マーカーの測定値間の相関について、各々の腫瘍マーカーの散布図および相関係数から検討した。

2) 各検査の単独での、膵癌—良性疾患鑑別能を、ROC 曲線 (relative operating characteristic curve) を用いて検討した。

3) 各群の分布をできるかぎり正規分布に近付け、各々の分散をできるだけ等しくするために、データはすべて対数変換して統計処理した。

4) 上記の検討結果を踏まえ、最終的な判別式は、逐次変数増減法により採用項目を選択し、判別分析により作成した。

5) 上記の統計解析には、パーソナルコンピュータ (NEC: PC-9801) と SAS プログラムを用いた。

## 成 績

1) 各腫瘍マーカーの膵癌—膵胆道良性疾患の鑑別能と、腫瘍径との相関。

各腫瘍マーカーの散布図の検討から、リパーゼ、エラスターゼ、トリプシンなどの膵酵素は、腫瘍径との相関係数がマイナスであり、おおそ腫瘍径 4 cm を境に、腫瘍径が大きくなると逆に値が低くなる傾向を認めた。そこで ROC 曲線による膵癌と良性膵胆道疾患の鑑別能を、4 cm 未満と以上に分けて検討したところ、4 cm 未満の腫瘍群では、DUPAN-2 と TPA の鑑別能が最良で、4 cm 以上の群では CA-19-9, CA50, CEA などが良好な鑑別能を示した。アミラーゼ、エラスターゼなどの膵酵素では、4 cm 以上ではむしろ癌の方が低くなる傾向を認めた。そこでこれらの腫瘍マーカーは、鑑別能が高く、腫瘍径と相関のある A 群 (CA19-9, CEA, CA50 など)、鑑別能が高いが、腫瘍径と相関がない B 群 (DUPAN-2, TPA)、鑑別能は低く、腫瘍径と相関しない C 群 (IAP, PSTI など)、腫瘍径と逆相関し、大きな癌ではむしろ良性疾患より低くなる D 群 (エラスターゼ 1, リパーゼなど) の 4 群に大別できることが判明した。

## 2) 判別式。

以上の結果をふまえ、判別式は腫瘍系 4 cm 未満の膵癌群 (15 例) と良性患者群 32 例を判別する判別式 A,

4 cm 以上の膵癌群 (17 例) と良性疾患群とを判別する判別式 B の 2 種類を作成した。

$$\text{判別式 A : } Z = -77.523 + 2.144 \times \log(\text{CA19-9}) + 5.514 \times \log(\text{TPA}) - 3.057 \times \{(\text{Ferritin}) \times (\gamma\text{-GTP})\} + 5.568 \times \log(\text{DUPAN2}) + 19.048 \times \log(\text{LDH}) + 2.411 \times \log(\text{Lipase}) + 3.888 \times \log(\text{ALP})$$

$$\text{判別式 B : } Z = -36.551 + 4.908 \times \log(\text{CA19-9}) + 9.939 \times \log(\text{TPA}) - 7.241 \times \log(\gamma\text{-GTP}) + 1.679 \times \log(\text{Ferritin}) - 4.779 \times \log(\text{Lipase}) + 8.344 \times \log(\text{ALP})$$

臨床例における判別は、未知検体の測定結果を各々の判別式に代入し、両判別式のうちいずれか一方が陽性の場合は陽性と判定し、いずれも陰性の場合陰性と判定した。

膵癌と膵胆道疾患の判別モデルに用いた各々 32 例の症例の判別は、レトロスペクティブに行い、感度、特異性、正診率を算定した。結果は表 2 に示すごとく、膵癌 32 例はすべて陰性と判定され、良性疾患 32 例はすべて陰性と判別された。この成績を、各々単独の腫瘍マーカーの判別成績と比較すると、結果は

表 2 CAMPAS による膵癌 (上段 ; 4 cm 未満, 下段 ; 4 cm 以上) と良性疾患の判別結果

		判別式(A)による推測		計
		$Z \geq 0$	$Z < 0$	
診 断	膵癌	15	0	15
	良性	0	32	32
計		15	32	47

Sensitivity : 15/15 (100%)

Specificity : 32/32 (100%)

Accuracy : 47/47 (100%)

		判別式(B)による推測		計
		$Z \geq 0$	$Z < 0$	
診 断	膵癌	17	0	17
	良性	0	32	32
計		17	32	49

Sensitivity : 17/17 (100%)

Specificity : 32/32 (100%)

Accuracy : 49/49 (100%)

表3 膵癌32例と良性膵胆道疾患32例の判別における各項目の正診率

項 目	正 常 値 (cut off 値)	感 度 (Sensitivity)	特 異 性 (Specificity)	正 診 率 (Accuracy)
CAMPAS		100.0%	100.0%	100.0%
CA19-9	100U/ml	84.4%	87.5%	85.9%
CA19-9	37U/ml	90.6%	65.6%	78.1%
CA50	35U/ml	84.4%	84.4%	84.4%
DUPAN2	150U/ml	90.6%	75.0%	82.8%
TPA	110U/l	81.3%	81.3%	81.3%
IAP	500 $\mu$ g/ml	65.6%	84.4%	75.0%
CA125	35U/ml	56.3%	81.3%	68.8%
CEA	2.5ng/ml	46.9%	71.9%	65.6%

表3に示すごとくであり、CAMPAS システムによる判別は、どの腫瘍マーカー単独の成績よりも、感度、特異性、正診率ともに優れていた。膵癌であるにもかかわらず、CA19-9 100U/ml 以下、または DUPAN2 150U/ml 以下を示した、いわゆる偽陰性例は5例あり、これらの症例においても CAMPAS システムによる判別はすべて陽性であった。逆に良性疾患であるにもかかわらず CA19-9 が 37U/ml 以上、または DUPAN2 が 150U/ml 以上を示したいわゆる偽陽性例は11例あり、この中には CA19-9 1700U/ml, DUPAN2 570U/ml という著名な高値例を含んでいたが、これらも本システムではすべて陰性に判別された。

## 考 察

Koprowski ら<sup>1)</sup>によって開発された腫瘍マーカーである CA19-9 は、モノクローナル抗体によって認識される血液型物質関連の I 型糖鎖に属する糖鎖抗原で、膵臓癌の80から90%に陽性という優れた診断能を有している<sup>2)</sup>、しかし CA19-9 は慢性膵炎や総胆管結石症などの良性疾患においても陽性になる例が存在すること、ルイスの血液型による偽陰性例が存在することなどが、臨床上問題となっている。また、その後いくつかの新しいモノクローナル抗体<sup>3)</sup>が開発されているが、いまだ単独で明らかに CA19-9 を凌駕するマーカーは開発されていない。現在膵

臓癌の診断に臨床的に用いられている広義の腫瘍マーカーは、大きく分類すると以下のようになる。

1) モノクローナル抗体によって認識される糖鎖抗原 (CA19-9, DUPAN2 など)。2) いわゆる癌胎児性抗原 (CEA, POA など)。3) 膵臓で産生される酵素, 蛋白 (エラスターゼ1, リパーゼ, PSTI など)。4) いわゆる非特異的な腫瘍マーカー (TPA, IAP, フェリチンなど)。5) 一般的検査に属するもので、腫瘍の診断の補助となるもの (LDH, CRP など)。

しかしどの腫瘍マーカーも、単独での診断能には明らかに限界がある。そこで複数の腫瘍マーカーをコンビネーションで測定することにより、診断能を向上させようという試みがなされて来た。しかし複数の項目を測定すれば、なるほど感度は増加するが、一方特異性は低下し、多数の偽陽性例を生み出すことになってしまう。この偽陽性例の増加は、癌の早期発見のための必要悪としてあまり重大視されない傾向があるように思われるが、実際には医療側にとっても患者側にとっても著しい非能率的な労力、負担を強いられる上に医療費のいたずらな増大をもたらし、極めて重大な問題であると思われる。そこで複数の腫瘍マーカーから得られる情報から出来る限り高い正診率を導き出す試みとして、多変量解析システムの導入をおこなった。多変量解析システムは、種々の科学領域において広く応用されているが、腫瘍マーカーによる生化学診断に応用されている報

告は少ない。

Yamamura ら<sup>4)</sup>は膵癌の診断に、CA19-9、エラスターゼ1の2項目の腫瘍マーカー値による判別分析を導入し、個々のカットオフ値を用いるよりも良好な判別成績を得たと報告している。しかしこの判別式を用いる方法では、特異性は明らかに向上するものの、感度はわずかにではあるがむしろ低下してしまう。また比較的小さな腫瘍より、大きな腫瘍で偽陰性例が生じるという問題がある。これはCA19-9は腫瘍容積との相関をもって上昇するのに対し、エラスターゼ1は大きな腫瘍ではむしろ低下するという、異なったパターンを持っているにもかかわらず、判別式にその傾向を考慮していないためと思われる。今回の我々の検討では、4 cm以上の膵癌と4 cm以下の膵癌に対して2種の異なる判別式を作成することにより、非常に良好な判別成績を得ることが出来た。しかも最終的に採用された項目は8項目であり、その中にはLDHなどのむしろ一般的検査に属するものがふくまれており、保険診療の観点から考えても十分に日常臨床に応用可能であると思われる。また今後プロスペクティブなデータを集積することにより、さらに改良が可能なシステムであると考えられ、膵臓癌の生化学的診断として非常に有用であると考えられた。

本研究に協力いただいた富山医科薬科大学内科学第3教室 西村信行、山崎国男、田口恭仁子、元尾南洋、渡辺明治、県立ガンセンター新潟病院内科 小越和栄、丹羽正之、SRL研究部 古川敏仁、塚田 裕の諸先生に感謝します。

## 文 献

- 1) Koprowski H., Herlyn M., Steplwski Z., et al. : Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* **212** : 53—55, 1981.
- 2) Del Villano B. C., Brennan S., Brock P. et al. : Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody defined tumor marker, CA-19-9. *Clin. Chem.* **29** : 549—552, 1983.
- 3) Metzgar R. S., Gaillard M. T., Levines S. J. et al. : Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cell defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **42** : 601—608, 1982.
- 4) Yamamura H., Tatsuta M., Ito M. et al. : Effectiveness of discriminant analysis of serum CA19-9 and Elastase 1 in diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* **4** : 401—405, 1989.

## 前立腺癌における腫瘍マーカー

布施秀樹, 梅田慶一, 坂井健彦, 藤城儀幸, 水野一郎, 風間泰蔵, 片山 喬

富山医科薬科大学泌尿器科学教室

### はじめに

前立腺癌の腫瘍マーカーといえば酸性フォスファターゼがあげられ, この測定は前立腺癌の臨床に不可欠であり, もっとも頻用されているマーカーである<sup>1)</sup>。また本マーカーはその後, 測定法に改良が加えられ特異性や感度が増した<sup>2)</sup>。しかし早期癌の診断や再燃の早期発見などについて必ずしも満足のいくものではない。

近年,  $\gamma$ -セミノプロテイン<sup>3)</sup> ( $\gamma$ -seminoprotein, 以下  $\gamma$ -Sm) や前立腺特異抗原<sup>4)</sup> (Prostatic Specific Antigen, 以下 PA) など前立腺に特異的な抗原の測定が臨床応用されるようになり, さらに特異性は低いとはいえ, Tissue Polypeptide Antigen<sup>5)</sup> (以下 TPA) や Basic Fetoprotein<sup>6)</sup> (以下 BFP) などのマーカーも加わり, 前立腺癌の腫瘍マーカーは新しい展開をみるにいたった。

そこでこれらマーカーについて前立腺癌の診断や臨床経過の把握における有用性について比較検討した。

### 対象および方法

富山医科薬科大学附属病院泌尿器科で1979年より1989年までに経験した前立腺癌 101例のうち血中腫瘍マーカーを測定しえた83例を対象とした。stage A 9例, stage B 10例, stage C 20例, stage D 44例であり, 病理組織分化度<sup>7)</sup>は高分化型23例, 中分化型36例, 低分化型20例, 不明のもの4例であった。

stage A および B は前立腺全摘除術, stage C および D は内分泌療法 (去勢および直後よりジェチルスチールベストロール・2リン酸 500mg, 4 週投与以後ヘキセストロール30mg, 最近ではエチニルエストラジオール1.5mg内服) を主体として治療した。stage C のうち内分泌療法により局所が十分に萎縮した例

には前立腺全摘除術を追加した。

腫瘍マーカーとして前立腺性酸性フォスファターゼ (Prostatic Acid Phosphatase, 以下 PAP),  $\gamma$ -Sm, PA, TPA および BFP について検討した。PAP については酵素法 (PAP(enz)) およびラジオイムノアッセイ法 (PAP-RIA) にて測定した。前者は King-Armstrong 法, 後者は栄研キットにて測定し, それぞれの cut off 値は, 1.3KAU および 3ng/ml である<sup>1)</sup>。 $\gamma$ -Sm は  $\gamma$ -Sm 測定用キット (EIA) (中外製薬)<sup>3)</sup>, PA は PA 測定用キット (RIA) (栄研)<sup>8)</sup>, TPA は Sangtec 社製キット (RIA) および BFP は サンドイッチ EIA 試薬 (日本化薬) を用いて測定した<sup>6)</sup>。おのおのの cut off 値は 4ng/ml, 7.5ng/ml, 124U/l および 75ng/ml とした。

これら腫瘍マーカーを治療前, 内分泌療法後 4 週, 治癒中および再燃時等の各時期において測定した。

なお前立腺癌の陽性率を sensitivity (感度), 前立腺肥大症の陰性率を specificity (特異性) とした。sensitivity と specificity の積を efficiency (診断効率) とした。

### 結 果

#### 1. 前立腺癌の PAP(enz), PAP-RIA, $\gamma$ -Sm および PA の陽性率

PAP(enz) では, stage A, B ではすべて陰性, stage C で 1 例 (11%) のみが陽性, stage D では 81% が陽性であった。したがって PAP(enz) 陽性なのは stage D の可能性が大といえる。PAP-RIA では stage がすすむほど陽性率が高かったが stage B, C でもかなりのものが陽性であり, PAP(enz) より全体の陽性率が高かった。 $\gamma$ -Sm, PA は, PAP-RIA と同様の傾向を示したが, stage B においてともに陽性率 80% と, PAP-RIA に比べて高い陽性率を示した (図 1)。

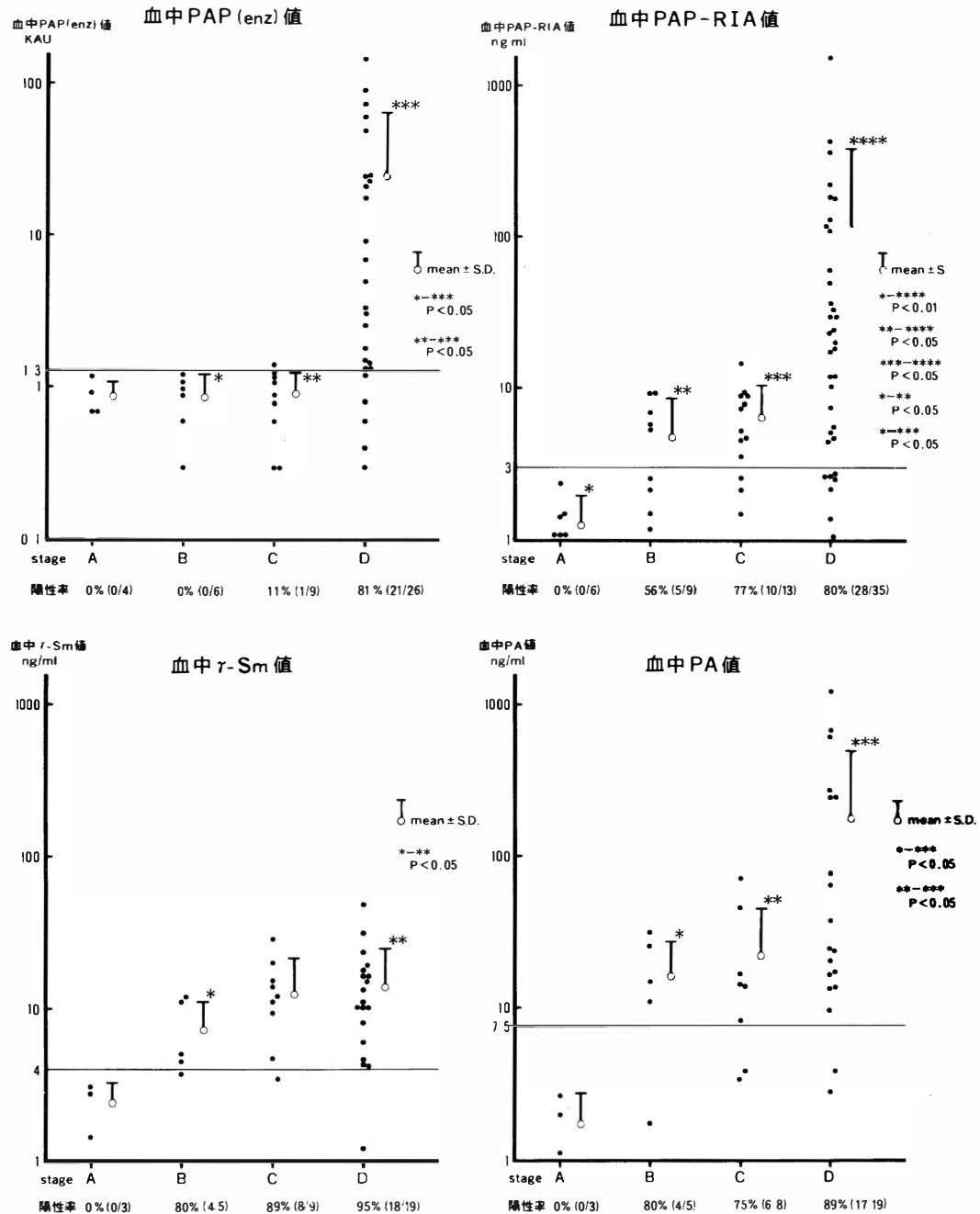


図1 未治療前立腺癌における各腫瘍マーカー

## 2. PAP-RIA, γ-Sm, PA の sensitivity, specificity, efficiency

PAP-RIA, γ-Sm および PA の前立腺癌における陽性率すなわち sensitivity はそれぞれ68%, 83%, 77%であり後2者が高かった。specificity はおのおの95%, 93%, 93%と差がなかった。したがって efficiency は γ-Sm, PA がそれぞれ77%, 72%と PAP-RIA の65%より高かった。

## 3. 前立腺肥大症および前立腺癌における PAP-RIA, γ-Sm, PA 3種マーカーの組み合わせによ

## る陽性率

PAP-RIA, γ-Sm, PA のそれぞれ単一測定の場合, 前立腺肥大症の陽性率は, 5~7%であった。一方, 複数マーカーを同時に測定し, 2種あるいは3種同時に陽性のものをみると, 前立腺癌では単一測定の場合に比し, その陽性率は低値となったが, 前立腺肥大症では γ-Sm および PA が同時陽性のもの1例のみで他には陽性のものがなく, 複数マーカーが同時陽性の場合は前立腺癌の可能性が大といえた(表1)。

表1 複数マーカーによる前立腺肥大症および前立腺癌のマーカー陽性率

		前立腺肥大症	前 立 腺 癌			
			stage A	stage B	stage C	stage D
単 一 マ ー カ ー	PAP-RIA (+)	4.8% (2/42)	0% (0/2)	75% (3/4)	75% (3/4)	68% (13/19)
	$\gamma$ -Sm (+)	7.1% (3/42)	0% (0/2)	100% (4/4)	100% (8/8)	95% (18/19)
	PA (+)	7.1% (3/42)	0% (0/2)	75% (3/4)	75% (6/8)	89% (17/19)
複 数 マ ー カ ー	PAP-RIA (+) $\gamma$ -Sm (+)	0% (0/42)	0% (0/2)	75% (3/4)	75% (6/8)	68% (13/19)
	PAP-RIA (+) PA (+)	0% (0/42)	0% (0/2)	75% (3/4)	50% (4/8)	68% (13/19)
	$\gamma$ -Sm (+) PA (+)	2.4% (1/42)	0% (0/2)	75% (3/4)	75% (6/8)	84% (16/19)
	PAP-RIA (+) $\gamma$ -Sm (+) PA (+)	0% (0/42)	0% (0/2)	75% (3/4)	50% (4/8)	68% (13/19)

#### 4. 治療前および治療後4週のマーカーの変動

PAP-RIA,  $\gamma$ -Sm, PA それぞれ24例中13例 (54%), 15例中8例 (53%), 13例中5例 (38%)のものが4週で陰性化した。陰性化しないものも大部分が低下傾向を示した。1例, PAP-RIA 値が高値となった例があったが, この例は内分泌療法無効例であった。

#### 5. 再燃時のマーカー

再燃例における PAP-RIA,  $\gamma$ -Sm, PA のそれぞれの陽性率は79%, 85%, 86%であり, 後2者の陽性率は, PAP-RIA のそれより高かった(図2)。3者のうちどれか1つが陽性のものは22例中21例(95%)であり再燃のチェックにおける複数マーカーの有用性が示された。

一方, 制癌例では PAP-RIA の陽性率は88例中6例 (7%),  $\gamma$ -Sm, PA のそれは, それぞれ39例中5例(13%), 38例中4例(11%)であり, 各マーカーとも再燃例で有意に陽性率が高かった(3種マーカーとも  $\chi^2$  検定で  $p < 0.05$ )。

#### 6. 血中 TPA 値

治療前(8例), 制癌中(16例), 再燃時(6例)での TPA の平均値はおおの363.6  $\pm$  343.0U/l, 165.2  $\pm$

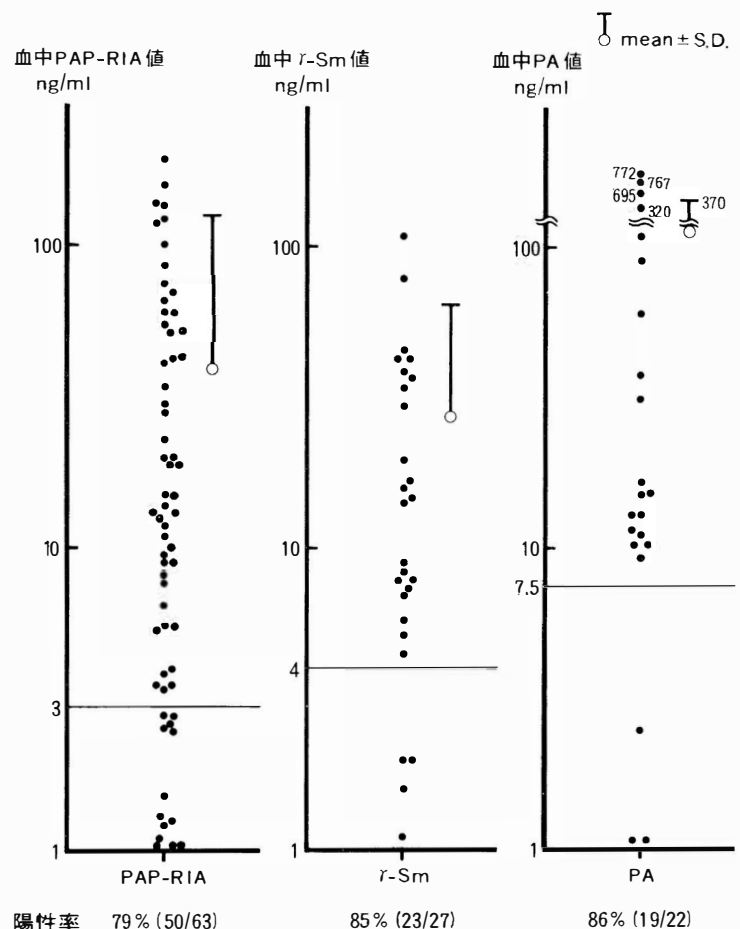


図2 再燃時の各腫瘍マーカー

54.3U/l, 315.7  $\pm$  219.6U/l であり, 制癌例で低値の傾向を示した。一方, 前立腺肥大症を含む良性疾患



でのそれは,  $151.3 \pm 70.5 \text{ U/l}$  であり59%の陽性率であった。

## 7. 血中 BFP 値

治療前(7例)の BFP 値は  $87.0 \pm 44.2 \text{ ng/ml}$ , 制癌中(19例)のものは  $130.4 \pm 230.4 \text{ ng/ml}$ , 再燃例(6例)では  $170.5 \pm 136.3 \text{ ng/ml}$  と3者に統計的有意差はなかったが, 陽性率では, それぞれ57%, 37%, 68%で制癌例で陽性率が低い傾向を見た。

## 考 察

前立腺癌の腫瘍マーカーのうち酸性フォスファターゼは古くから知られており, 臨床応用されてからすでに50年を経過する<sup>1)</sup>。まず酵素活性の測定による定量法が施行された。この酵素法により総酸性フォスファターゼおよび PAP が定量されるが, 前者は赤血球由来の酸性フォスファターゼなどを含むことより溶血などの影響を受けやすい。したがって今回 PAP(enz) について検討したが, stage C までの前立腺癌では, ほぼ正常範囲内にあり, stage D になってはじめて陽性となり, 本法の感度は低いといえる。1970年代に入って新しい測定法が登場したが, 現在本邦では二抗体法すなわち RIA 法が主に使用される<sup>2)</sup>。RIA 法での stage 別の陽性率は A, B ではさまぎまであるが, C では50%以上, D では80%以上とするものが多く<sup>9, 10)</sup>, 自験例でも同様の傾向にあった。しかし RIA 法は酵素法に比し感度の上昇がみられたものの前立腺肥大症と stage A や B のような早期癌との鑑別ができないことおよびこのような高感度の方法でも転移のあるものすべてが異常値とならないことなどマーカーとしての限界がみられる。

前立腺に特異的な物質として PA が見い出され, Chu らによって測定法が開発された。前立腺癌で stage A, B の早期癌でも陽性となり, stage D で80%以上が陽性となるとされている<sup>11, 12)</sup>。自験例においても stage B で80%の陽性率であり, 早期癌での高い陽性率が注目に値する。一方精漿より特異物質と考えられるものが2つ分離され, そのひとつが前立腺癌患者血清中で高値を示すことが判明し,  $\gamma\text{-Sm}$  と命名された<sup>3)</sup>。前述の PA とおそらく類似または同一物質と考えられるが未だ確定的ではない。

ちなみに自験例では早期癌で高い陽性率を示すなど両抗原の類似性を裏付ける結果であったが, 臨床的にこれらの抗原は必ずしも平行した動きを示さないとする意見もある<sup>13)</sup>。

PAP-RIA,  $\gamma\text{-Sm}$ , PA はいずれも高い感度を示す腫瘍マーカーといえるが5~10%の false positive がいわれており<sup>14)</sup>, 自験例でも同様の結果であった。そこで今回複数マーカーを同時に測定し2種または3種同時陽性のものをみたところ前立腺肥大症ではこのようなものは1例のみであり, 複数マーカーが同時陽性の場合には前立腺癌の疑いが強いといえた。すなわち複数マーカーの測定によりある程度, 前立腺肥大症と前立腺癌を鑑別することができるものと思われる。

腫瘍マーカー測定のもうひとつの意義として治療効果の判定, 制癌状態の把握および再燃のチェック等, モニターとしての役割がある。自験例で内分泌療法により効果をみとめた例の大部分はマーカーの陰性化ないしその低下傾向をみとめたのに対して, 内分泌療法無効のものはマーカーが上昇しており, 治療効果とマーカーの変動は平行しているといえた。制癌例についても各マーカーともほとんどの例で cut off 値内であり臨床所見と一致した結果であった。一方, 再燃時, 各マーカーとも高い陽性率を示したが,  $\gamma\text{-Sm}$  および PA は PAP-RIA より陽性率が高く, 前2者は再燃をチェックするモニターとしての有用性が高いといえる。ちなみに Siddall ら<sup>15)</sup>は再燃時  $\gamma\text{-Sm}$ , PA は PAP-RIA より早期に上昇するとし, Williams は PA は臨床的な再燃の診断の時期より平均6ヵ月前に上昇をみたとしている。

次に TPA や BFP についてはどうであろうか。TPA は自験例にみられた如く false positive が多く<sup>5)</sup> 診断に用いる意義は少ないが, 制癌例より再燃例で陽性のものが多く, 病状の把握には役立つ可能性がある。BFP は最近前立腺癌に応用されつつあるが特異性に乏しく, TPA と同様, 再燃をチェックするためのモニターとしての役割にとどまるだろう。

## 結 語

1979年より1989年までに富山医科薬科大学附属病

院泌尿器科で経験した前立腺癌のうち腫瘍マーカーを測定しえた83例について検討し以下の結果をえた。

- 1) PAP(enx), PAP-RIA,  $\gamma$ -Sm, PAの陽性率はstageの進行とともに高くなる傾向を示した。PAP(enx)はstage Dで陽性になるといえた。後2者はstage Bでも陽性率が高かった。
- 2) 複数マーカー(PAP-RIA,  $\gamma$ -Sm, PA)陽性なのは、前立腺癌の疑いが強いといえた。
- 3) 治療によるマーカーの変動と臨床経過はよく一致し、制癌状態では各マーカー(PAP-RIA,  $\gamma$ -Sm, PA)とも大部分がcut off値内にあった。
- 4) 再燃時、マーカーの上昇をみたが、 $\gamma$ -Sm, PAはPAP-RIAに比し陽性率が高くモニターとしての意義が大きかった。
- 5) TPAおよびBFPはともに特異性に乏しく、診断という点からは意義が少ないが、臨床経過のモニターとしての有用性があった。

## 文 献

- 1) 島崎淳, 布施秀樹: 前立腺癌の腫瘍マーカー. 泌尿 39 : 379-386, 1985.
- 2) 布施秀樹, 島崎淳: 前立腺癌と酸性フォスファターゼ. 医学と薬学14 : 629-634, 1985.
- 3) 布施秀樹, 榊鏡年清, 片海善吾, 島崎淳: 前立腺癌患者血清中  $\gamma$ -セミノプロテイン. 泌尿紀要31 : 81-85, 1985.
- 4) 布施秀樹, 赤倉功一郎, 秋元晋, 島崎淳: 前立腺癌患者血清中の前立腺特異抗原の検討. 泌尿紀要33 : 1049-1053, 1987.
- 5) 風間泰蔵, 片山喬, 山崎典昌: 泌尿器科領域における血清および尿中 Tissue Polypeptide Antigen(TPA)の検討. 泌尿紀要 31 : 2113-2118, 1985.
- 6) 石井勝, 服部信, 加藤俊ほか: Basic Fetoprotein EIA キットの臨床的検討(1)血清 BFP の臨床的有用性. 癌と化学療法15 : 2107-2113, 1988.
- 7) 日本泌尿器科学会, 病理学会編: 泌尿器・病理前立腺癌取扱い規約, 第1版. 金原出版, 東京, 1985.
- 8) 小川祐司, 森川惇二, 大沢劉三郎ほか: 前立腺特異抗原(Prostate Specific Antigen)の精製とその測定法. Radioisotopes 33 : 273-278, 1984.
- 9) Cangh P. J. V., Opsomer R. and Nayer P. H. D. : Serum prostatic acid phosphatase determination in prostatic diseases : A critical comparison of an enzymatic and a radio-immunologic assay. J. Urol. 128 : 1212-1215, 1982.
- 10) Debruyne F. M., van Munster P. J. J., van Groeninghen J. C. and Kirkels W. J. : Radio-immunoassay(RIA) for prostatic acid phosphatase in patients with prostatic carcinoma. Urol. Res. 12 : 233-237, 1984.
- 11) Kuriyama M., Wang M. C., Papsidero L. D. et al. : Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. Cancer Res. 40 : 4658-4662, 1980.
- 12) 三木 誠, 町田豊平, 柳沢宗利ほか: RIA による前立腺特異抗原(PA)測定の臨床的評価. 日泌尿会誌75 : 1982-1988, 1984.
- 13) Arai Y., Yoshiki T., Okada K. and Yoshida O. : Multiple marker evaluation in prostatic cancer using prostatic specific antigen, gamma-seminoprotein and prostatic acid phosphatase. Urol. Int. 44 : 135-140, 1989.
- 14) 塚本泰司, 熊本悦明, 山崎清仁ほか: 前立腺癌における腫瘍マーカーの臨床的検討-Prostatic acid phosphatase, Prostatic antigen,  $\gamma$ -seminoprotein の同時測定による検討一. 泌尿紀要 34 : 987-995, 1988.
- 15) Siddall J. K., Shetty S. D. and Cooper E. H. : Measurement of serum-seminoprotein and prostate specific antigen evaluated for monitoring carcinoma of the prostate. Clin. Chem. 32 : 2040-2043, 1986.
- 16) Williams R. D. : This month in investigative urology : prostate-specific antigen. J. Urol. 140 : 1030-1031, 1988.

# 婦人科領域における腫瘍マーカーの現況 ——とくに CA125 について——

新 居 隆

富山医科薬科大学産科婦人科学教室

婦人科領域における腫瘍マーカーの現況を検討するに際し、マーカーが臨床診断学上どのような段階に用いられ得るかを考えねばならない。第1に、それは早期診断としてのマススクリーニング（いわゆる癌検診）においてであり、第2に診療施設を訪れた患者群のハイリスクグループに対するスクリーニング、第3に腫瘍性疾患を疑った際の補助診断あるいは鑑別診断、第4に治療効果を判定するための指標として、そして最後に第5として治療後の follow up における再発の早期診断法として、腫瘍マーカーが、それぞれの場面でどの程度有用であるかを検討せねばならない。

表1には現在我々が婦人科悪性疾患に対し用いている主な腫瘍マーカーを示した。

表1 婦人科における腫瘍マーカー

マーカー	特異性の高い腫瘍臓器
CEA	卵巣・子宮頸部・子宮体部
$\alpha$ FP	卵巣（胚細胞性腫瘍）
HCG	絨毛性疾患
Estradiol	卵巣（ホルモン産生腫瘍）
CA125	卵巣・子宮体部・子宮頸部（腺癌）・子宮内膜症
CA199	卵巣
TPA	卵巣
SCC	子宮頸部（扁平上皮癌）・外陰癌・陰癌

## 1. 早期診断法としての腫瘍マーカーの現況

婦人科悪性腫瘍は、主として子宮頸癌、子宮体癌、及び悪性卵巣腫瘍の3種の疾患で構成される。このうち、子宮頸癌はすでに細胞診による癌検診が普及し異型上皮や上皮内癌を含む初期病変の発見に大きく寄与しており、外来診療においてコルポスコピー

を併用することにより発見率・正診率はかなり向上した。子宮体癌は、現在全国的に癌検診として実施されてはいないが、細胞診がやはり最も有力な手段である。従って、現段階で前2者の早期診断に腫瘍マーカーを導入することは考えられない。

一方、悪性卵巣腫瘍は、従来より適当な早期診断法がないだけに、画像診断法（超音波断層法）と共に、血清診断（腫瘍マーカー）が、その有力な手段として期待されている。我々は試みとして、県内女子短大の集団検診に超音波断層法を導入し4550名の対象より14名に卵巣腫瘍を発見し、1名の見逃し例（検診後1年以内に腫瘍を診断された）を経験した。但し、悪性卵巣腫瘍好発年齢ではないため、すべて良性卵巣腫瘍及び類似疾患であった。腫瘍マーカーによる癌検診の試みは当然発想されるものではあるが、今のところ具体的な展望はひらけていないのが現状である。

## 2. CA125 について

さて、悪性卵巣腫瘍の大半は上皮性腫瘍であるので、これらの腫瘍での4種の主なマーカーの陽性率を自験例で検討したところ（表2）、CA125 が特に高い陽性率を示した。そこで、以下の検討は CA125 を対象として行なうこととした。

表2 悪性卵巣腫瘍における主たる腫瘍マーカーの陽性率（%）

	上皮性悪性腫瘍	原発性悪性腫瘍	全悪性腫瘍
CA125	90.6	84.2	84.4
CA199	54.2	44.8	45.7
TPA	57.1	48.0	58.1
CEA	15.9	16.7	22.9

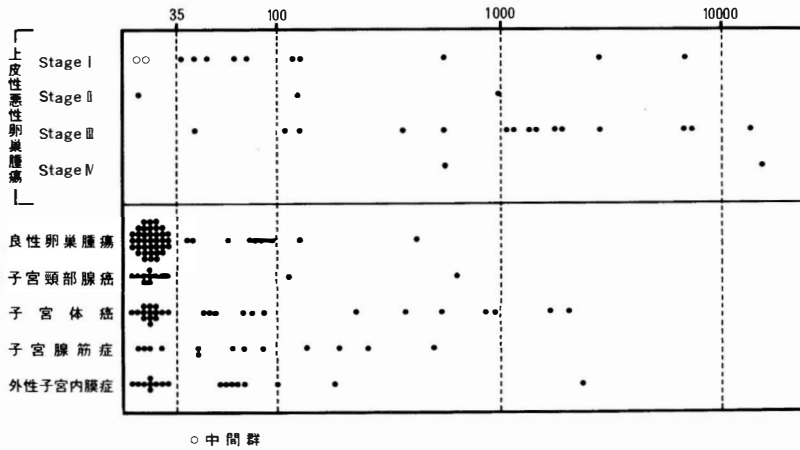


図1 上皮性悪性卵巣腫瘍進行期別CA125値とその他の婦人科疾患の比較

CA125は1981年に、Bastらが発表した上皮性卵巣癌患者腹水浮遊細胞より得た腫瘍抗原で分子量200,000以上の糖蛋白である。卵巣腫瘍（特に悪性卵巣腫瘍）のほか Müller 管由来の組織上皮（子宮内膜、子宮頸管上皮など）に検出される。卵巣腫瘍では非ムチン性腺癌で特に高い陽性率と測定値が観察される。

### 3. 早期診断法・治療前診断法としての CA 125 の評価

図1には、上皮性悪性卵巣腫瘍の進行期別 CA125 値を、そのほかの婦人科疾患の場合と比較して示した。進行期分類 I 期の症例においても cut off 値35を越える陽性例は、悪性度の低い2例の中間群を除くと、ムチン性腺癌を含めても100%であるが、良性卵巣腫瘍、子宮頸部腺癌、子宮体癌、内性子宮内膜症(子宮腺筋症)、外性子宮内膜症でも陽性例が多く、またそれらの測定値は、かなりの高値を示すので、CA125の測定値のみにて卵巣癌を高い正診率で発見することは不可能である。また、月経期、妊娠中の婦人においても CA125 は高値を示すほか、腹水、胸水の貯留や炎症性疾患においても異常な値がしばしば観察されることも忘れてはならない。多種のマーカー測定による、いわゆる combination assay の試みもなされているが、その正診率と cost performance に問題があり現実化にはいたっていない。外来診療レベルにおいても試みられているが、同様の問題が未解決である。画像診断（超音波断層法）は、血清診断にくらべ、その場で診断がなされ得るうえ、経腔的アプローチにより、1 cm 以下の大きさ

の腫瘍でも条件によっては明瞭に検出され得るので、画像診断を主とし、血清診断を従とするような方法のほうが、現実性があるのではないと思われる。

また、良性・悪性の鑑別に於いても、画像診断と血清診断では、少なくとも血清診断が画像診断法よりすぐれているとはいえない。

### 4. 他の婦人科疾患診療への CA 125 の応用

本論からはずれるが、CA125 測定値は現在悪性病変のマーカーとして用いられるほか、子宮内膜症の診断に応用されていることを特筆しておきたい。本疾患、特に外性子宮内膜症は、激しい月経痛や不妊症の主要な原因疾患として多くの成熟期婦人を苦しめているが、従来、開腹以外に確定診断する方法はなかった。CA125 測定を補助的診断法として採用し腹腔鏡を積極的に行なうことにより、本症に対する我々の診断能力は著しく向上し、治療にも効果があがっている。

### 5. 治療効果評価の指標としての CA 125

CA125 測定値が治療効果をよく反映するならば、悪性腫瘍の治療を遂行する際に、これは有用な指標となる。

まず、手術にて腫瘍を摘出した例での手術前後の CA125 の変化は、全例明らかに著しい低下を示す。また、腫瘍が残存したり、摘出不能であった例でも、ある程度の腫瘍塊が存在すれば、経験的に、ほとんどの例で、腫瘍塊の増大縮小と CA125 値はよく相関するように思われる。従って、実施している治療方法が適確であるか否かを判断するうえで、実際の臨床では、有力な指標となっている。図2にその実例を示した。

症例 T. M. は、漿液性腺癌Ⅲ期の症例で1988年8月に手術を施行したが、試験開腹となった。術後、化学療法を開始したが、腹腔内腫瘍の大きさを超音波断層法で計測（2方向の径の積で表現）し、治療前の値を100として指数で表わした。CA125 値を対数目盛上にプロットすると、両者が非常によく相関していることがわかる。3回めの化学療法後は腫瘍

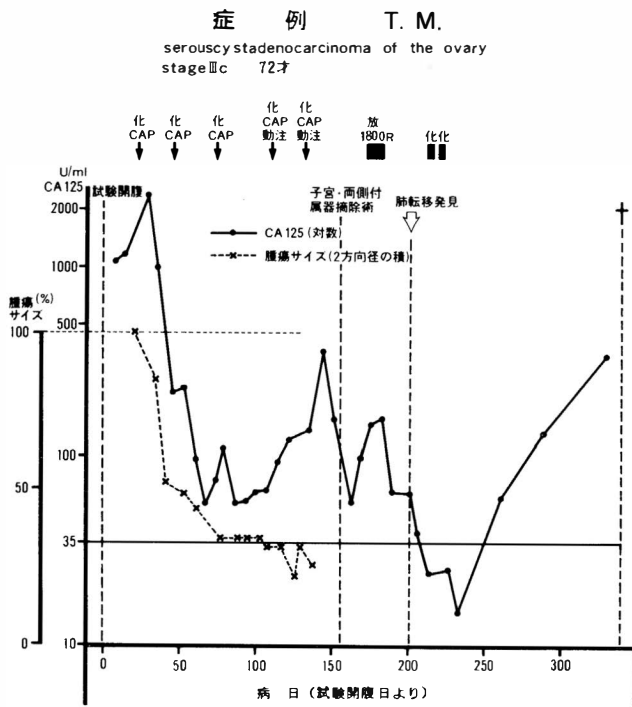


図2 漿液性腺癌Ⅲ期の一症例における  
CA125 値と腫瘍サイズの変化

の縮小傾向、CA125 の低下傾向は共にみられなくなり、CA125 はむしろその後上昇した。化学療法によるこれ以上の治療は無効と判断し、再開腹したところ、試験開腹時、小児頭大であった腫瘍塊は、こぶし大に縮小し、主な腫瘍を摘出することができた。周囲腸管への浸潤性癌組織が残されたので、術後放射線療法を実施した。その後、CA125 は低値が続いたが、術後3ヶ月で、肺転移巣が明らかとなった。しかし、この時には、CA125 値は、上昇しなかった。本例において、大きな腫瘍塊の残存している間は、CA125 は、治療効果をよく反映していたと評価できる。しかし、2回目の摘出術後は、病態の変化の指標とはなり得なかった。腫瘍塊が、小さくなったためであろうか。これは、ひとつには、CA125 の指標としての鋭敏性の問題があげられるが、また、化学療法や放射線療法により CA125 産生細胞の比率の変化がおこった結果とも推察できる。

従って、大体において、CA125 は病勢をよく反映し、治療効果の評価に有用なマーカーであるが、腫瘍が著しく縮小したり、CA125 測定値自体が cut off 値に近いレベルに低下した際には、必ずしも信頼できる指標であるとは云えないこと、また、治療によって腫瘍と腫瘍マーカーとの相関性に変化が生

じ得ることを忘れてはならないものと考えられる。

## 6. Second Look Operation 例での検討

前項で述べた問題点を精しく解析するには、臨床的にほとんど腫瘍の存在が検出できなくなった治療例の開腹所見と CA125 値を対比しなくてはならない。このような段階では、画像診断法も信頼性に乏しいからである。卵巣悪性腫瘍の治療過程において、Second Look Operation(以下 SLO) は、主にこのような段階の患者に対し施行される開腹術であって、開腹時に、横隔膜からダグラス窩にいたる全腹腔を肉眼的観察と触診、腹腔内洗浄細胞診、生検のほか腹膜外に対しても探査し、可能な限りのチェックを行なう。なお術前に各種レ線撮影、CT 又は MRI、Ga, Tc シンチ等を実施し臨床的にでき得る限り精査しておくことはいうまでもない。したがって、SLO は臨床的にもっとも信頼のおける検査法である。この際残存腫瘍があれば、できる限り摘除する。この SLO の結果に基いて、爾後の治療計画をたてることになるのである。

CA125 陽性卵巣癌患者で、ほとんど腫瘍を臨床的に検出し得なくなったもの11例に対し SLO が実施された。その結果を表3に示す。症例9は、開腹所見は NED であったが、CT では腹膜外に腫瘍の存在を疑われその後 CA125 は著しく上昇しているが、CT の画像には著変なく、現在、判断に苦慮している症例である。これを除いた10例のうち、SLO の

表3 Second Look Operation(SLO) 例における  
CA125 値と SLO 所見の対応の分析

症 例	初回治療値 CA125	SLO 時 CA125	SLO 所見	初回治療から SLO までの月数	SLO 後の 経過、月数
1. H M	66	8	NED	24	NED. 8
2. S H	120	10	NED	23	NED. 34
3. U M	15000	27	NED	15	NED. 4
4. M M	2870	8	NED	13	NED. 14
5. M O	74	< 8	NED	21	NED. 10
6. F T	6340	< 8	NED	27	NED. 1
7. H K	940	19	NED	6	ChemRec†. 29
8. E H	353	9	Tumor +	10	PD. 8
9. M K	1500	220	NED CT で Tumor + (?)	5	CA125†. 39
10. K I	1100	120	Tumor +	5	†. 24
11. Y M	174	20	Tumor +	13	†. 24

NED: No evidence of disease

Chem. Rec.: 他の再発の所見なくマーカーの値が正常から異常に変化し、且つその後、再発が診断された場合 Chemical Recurrence

PD: progressive disease

所見と一致した CA125 値を得たものは 8 例であった。重要なのは、SLO で腫瘍を認めた例での CA125 の値であるが、これは、3 例中 1 例でしか一致をみなかった。この事実は、CA125 の治療効果判定の指標としての限界を如実に物語っている。また、症例 7 は、SLO の結果 NED で、CA125 も cut off 値以下であったが、SLO 後 29 ヶ月に CA125 が上昇し、再発が確認された。

このように、治療がある程度奏功した症例において、その最終段階での病変の状態を評価する場合には、CA125 値は信頼性が乏しいといわざるを得ない。しかしながら、SLO を頻繁に行なうことは現実的に不可能であるから、SLO を補助する指標として、CA125 を今後、いかに評価し利用していくかが、極めて重要な課題であると思われる。

## 7. 再発の早期発見における CA125 の有用性

臨床的に「治癒」とした患者の follow up においては、いかに早く再発を診断できるかが、最も重要な課題であることは言うまでもない。

CA125 が臨床に用いられるようになって、まだ 5 年であるため、そのような再発例は少ないが、我々は、今のところ、2 例の Chemical Recurrence の症例を経験している。Chemical Recurrence とは、他に何ら再発の所見がなく、マーカーのみが正常値より異常値に転換し、その後、再発が確認されたものを言う。

そのうち 1 例は表 3 の症例 7 と同一の患者である。SLO 後正常であった CA125 が 164 まで上昇し、精査をくりかえした結果、約 3 ヶ月後に再発巣（転移巣）が発見された。もう 1 例は、子宮体癌Ⅱ期の症

例で、根治手術後 2 度にわたり、腔断端部にコルポスコープにより再発巣を発見し、その都度治療したが、3 度めの再発は、CA125 の上昇のみが先行し、精査をくりかえした結果、その約 4 ヶ月後に肺転移巣が発見された。

これら 2 症例は、CA125 が極めて鋭敏な再発の指標となり得ることを示している。しかし現在のところ、測定値の上昇だけで再発と断定し、ただちに副作用の強い治療を開始するには、まだマーカーとしての CA125 の価値を強く支持するだけの証拠が乏しく、これもまた、今後の重要な課題として残っている。

## ま と め

1) 婦人科悪性腫瘍の中で特に、卵巣腫瘍において、腫瘍マーカーの臨床的価値が大きい。

2) 腫瘍マーカーのなかでは、特に CA125 が臨床的価値が大きい。

3) しかし CA125 は、他の良性・悪性疾患でも高値を示すことがしばしばある。

4) 早期診断には、CA125 は単独で用いることはできないが、画像診断との併用により高い正診率が期待される。

5) 治療効果と CA125 の相関性は高いが、腫瘍が縮小したり、CA125 が低値となった場合には、信頼性に乏しい。しかし、治療法の選択・変更・中止の判断に際しては現状では有力な指標である。

6) 治療後の follow up において再発の早期診断に有力な指標となる可能性が高い。

## 就任講演

# 肝性脳症の病態と治療——潜在性脳症を中心に

渡 辺 明 治

富山医科薬科大学内科学第 3 教室

### はじめに

肝性脳症の発現機序と分枝鎖アミノ酸 (BCAA) 製剤による肝性脳症覚醒作用の機序については、今日なお明らかでない。私達は1984年以来、肝性脳症モデルにおける脳内アンモニアと分枝鎖アミノ酸との代謝相関を検討し、代謝コンパートメントに立脚した異なる脳領域の神経伝達アミノ酸代謝の異常を明らかにし、脳症の病態発生との関連性を追求してきた<sup>1)</sup>。

また、臨床的に意識障害がないと考えられる肝硬変例でも、鋭敏な、定量的な神経機能試験 (psychometric test) を用いることにより、動作性能力の低下が明らかにできる潜在性肝性脳症 (subclinical hepatic encephalopathy) を呈することが明らかにされてきた。

本講演では、肝性脳症の発現機序に関する神経伝達アミノ酸とアンモニアの役割について述べ、潜在性脳症の診断と治療法についての臨床成績を中心に報告したい。

### I. 肝性脳症の発現機序

#### 1) 脳内アンモニア輸送と血液脳関門

血中アンモニアの脳内輸送能を調節する機構の1つとして、血液脳関門 (血液と中枢神経との regulatory interface) の物質輸送能がある。ラットの頸動脈内にデオキシコール酸を注入し、酢酸アンモニウム液を持続投与すると、血中アンモニア濃度とは関係なく、大脳半球内 (注入側) のアンモニア濃度は著しく高くなる<sup>2)</sup>。この際の脳毛細血管内皮細胞の電顕的観察によれば、tight junction に変化はみられないものの星状膠細胞の足突起は腫大し、中分子物質の vesicular transport の亢進が示唆される。

さらに、肝硬変ラットと対照ラットに酢酸アンモニウム液を投与して、血中と脳内アンモニア濃度を同時に測定すると、血中アンモニアが例え同じであっても肝硬変の脳内アンモニア濃度が著しく高いことがわかる。このような結果は、従来脳内移行が極めて少ないと考えられていた  $\text{NH}_4^+$  も、血液脳関門の機能異常時には、脳内輸送が亢進することを示している。

#### 2) 脳内におけるアンモニアと分枝鎖アミノ酸の代謝相関

脳におけるアンモニア処理機構として、分枝鎖アミノ酸トランスアミナーゼと分枝鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素が重要と考え、肝性脳症モデル (四塩化炭素投与+肝部分切除) における脳、肝、骨格筋のこれら酵素活性を測定した。その結果、脳症モデルのトランスアミナーゼ活性は脳の脳上清とミトコンドリア分画でともに増加し、 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素もミトコンドリア分画で増加傾向を示した。さらに、cell-free 系で  $^{14}\text{C}$ -ロイシンの酸化能 (脱炭酸活性) は確かに亢進し、脳内アンモニア濃度と正の相関を示した。なお、アミノ酸の脳蛋白合成能は逆に著しく低下した。

さらに、分枝鎖アミノ酸を末梢静脈内に投与することにより、脳内アンモニア処理能が増加するか否かを in vivo で検討した。肝性脳症ラットに分枝鎖アミノ酸混合液を持続投与すると、脳内の分枝鎖アミノ酸とグルタミン酸 (Glu) の濃度は著増し、脳内アンモニア濃度の低下、頸動静脈アンモニア較差は有意に増大した。

### II. 神経伝達アミノ酸と脳幹シナプトソーム機能の異常

中枢神経系におけるアミノ酸やアンモニア代謝は

均一に営まれておらず、脳のどの部位の、どの代謝コンパートメントでの変化であるかを明らかにすることが重要である。

#### 1) 代謝コンパートメント

脳症モデルのアンモニア濃度を測定すると、血液より脳での増加率が大きく、脳幹では対照の4.3倍にも増加し、その最高値はmMレベルに達した。また、シナプトソーム分画のアミノ酸パターンを測定すると、全脳ホモジネートのそれとは異なり、Glu,  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA), アスパラギン酸 (Asp) が高い。前脳 (大脳皮質, 中脳, 視床・視床下部) の Glu と脳幹 (延髄と橋) の GABA 濃度は低下し、逆にグルタミン (Gln) はどの領域でも増加傾向を示し、従って、Glu/Gln は明らかに低下した。しかし、Glu/GABA, 興奮性神経伝達アミノ酸 (Glu + Asp) /抑制性神経伝達アミノ酸 (GABA + グリシン) の比には有意の変化はみられなかった<sup>3)</sup>。

また、シナプトソーム分画の Glu 脱炭酸酵素活には変化なく、粗神経膜分画と  $^{14}\text{C}$ -Glu と  $^{14}\text{C}$ -GABA 結合 (Kd, Bmax) に明らかな変化は観察されなかった<sup>4)</sup>。

#### 2) シナプトソーム・ミトコンドリア機能

シナプトソームのミトコンドリア分画を Whittacker の方法で分離、採取し、 $^{14}\text{C}$ -Gln を基質として生成される  $^{14}\text{C}$ -Glu をイオン交換カラムで分離する Prusiner らの方法でグルタミナーゼ (リン酸依存型) 活性を測定した。シナプトソームグルタミナーゼ活性は、塩化アンモニウムを 0.1mM, 1mM 添加すると強く阻害され、その他 1mM メタネチオールや Glu などでも同様の抑制が認められた。

以上の成績は、シナプトソーム内での Gln 利用に重要なグルタミナーゼ活性が  $\text{NH}_4^+$  など毒性物質により阻害をうけ、シナプトソーム内での神経伝達アミノ酸の合成低下が生じたものと考えられ、抑制性神経伝達アミノ酸の選択的な増加でないことが示された。

### III. 潜在性肝性脳症

肝硬変の病因のいかんを問わず、門脈―大循環性脳症 (portal-systemic encephalopathy) の最も軽微なものとされ、言語能力に異常を示すことなく動作能力が低下するのが特徴である。また、従来、

肝性脳症はあくまで機能的な概念とされてきたが、非侵襲的検査法としての CT や MRI 画像の普及とともに、大脳の器質的病変 (大脳萎縮や脳浮腫) が検出され、動作性能力試験の異常との関連性が注目されている。

#### 1) 診断法

臨床的には肝性脳症でないと判断される肝硬変例の神経機能を臨床的に把握する方法のうち、外来でも簡単に、短時間で、繰り返し施行できるものとして、WAIS 知能診断検査 (符号問題と積木問題)、音と光に対する反応時間、記号追跡試験の 5 項目を取りあげて検討した。そのうち 2 項目以上に異常が認められる場合を潜在性脳症と判定すると、肝性脳症 (顕性) 歴のない、よく代償された非アルコール性肝硬変例の 63% で潜在性脳症と診断できる。

#### 2) リスクファクター

肝硬変と診断されて 3 年以上を経て肝性脳症 (顕性) が出現した 22 例を retrospective に検討し、潜在性脳症を発現し易い危険因子を検討してみた。その結果、肝性脳症の既往、頭部 CT 所見で大脳萎縮、高アンモニア血症、門脈圧亢進症とくに太い門脈―大循環系短絡などの順で重要であることが明らかになった。とくに、頭部 CT, MRI による前頭葉萎縮の有無と腹部エコー、CT や MRI による太い門脈―大循環系短絡の検索が重要である。今後、リスクスコアを算出し、それを活用して臨床経過を観察し、高危険度群に対して毎月外来受診時に、血中アンモニアとともに動作性神経試験を繰り返し、より重点的なスクリーニングを試みる必要があると思われる。

### IV. 潜在性脳症の治療

潜在性脳症例は日常生活面 (高蛋白食を避け、自動車の運転を禁じる) で、他人をも事故に巻き込む可能性があり、積極的な治療が必要と思われる。ただ、自覚症状がなく、長期にわたる治療の継続性が必要であるため、治療の目的やその内容を患者自身がよく理解し、副作用の少ないことが望まれる。

#### 1) 植物蛋白食

植物蛋白には食物繊維が多く、メチオニンやアンモニア産生能の強いアミノ酸が少なく、アルギニンが多いなどの利点がある。大豆を中心に植物蛋白食を肝硬変例に投与すると、記号追跡試験、脳波所見



や窒素出納が改善し、排便重量の増加が認められた。

## 2) 分枝鎖アミノ酸製剤

分枝鎖アミノ酸を多く含有し、芳香族アミノ酸やメチオニン含量の少ない肝疾患用経口栄養剤（アミノレバン EN）により、肝性脳症を予防し、低蛋白栄養状態を改善し、Quality of life の向上に有益である。また、外来における潜在性脳症例の治療にも有効である。

## 3) 二糖類

今日世界中で広く使われるラクツロースは、甘味が強く、嘔気、鼓腸など腹部不快感をおこし、便回数の調整も難しい。そこで、同じ二糖類でも、ラクチトールは甘味が少なく、飲み易く、便回数の調整も容易である。そこで、潜在性脳症例に対してラクチトールを投与すると、定量的神経機能試験（動作性能力）の異常を改善し、問題となる副作用も少なく、長期の連用が可能である。

## 4) 亜鉛製剤

肝硬変例の血清亜鉛濃度は低下し、血中アンモニア濃度と負の相関を示す。亜鉛欠乏はオルニチントランスカルバミラーゼ活性（尿素回路）を低下させ、骨格筋のアンモニア処理酵素グルタミン合成酵素活性を低下させ、血中アンモニア濃度を高くする。酢酸亜鉛 600mg を各食後に分3投与すると、血清亜鉛濃度が正常化するとともに血中アンモニア濃度が低下し、神経試験の改善が認められる。

## おわりに

肝性脳症の発現機序解明への道のりは遠く、発想の転換に迫られている。また、わが国における潜在

性脳症の実態を早急に明らかにし、その適正な診断法の確立と効果的治療法の開発に努力を続けなければならない。

本講演の機会を与えていただいた富山医科薬科大学  
医学会会長 片山喬教授と、司会をして下さった佐々  
木 博副学長に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Watanabe A., Shiota T., Takei N. et al. : Ammonia detoxification by accelerated oxidation of branched chain amino acids in brains of acute hepatic failure rats. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 35 : 367-375, 1986.
- 2) Watanabe A., Tominaga S., Nagashima H. : Elevation of ammonia contents in the cerebral hemisphere following ammonia infusion during reversible opening of the blood-brain barrier. *Hiroshima J. Med. Sci.* 36 : 415-416, 1987.
- 3) Watanabe A., Shiota T., Takei N. et al. : Excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters and ammonia metabolism in hepatic failure rats. *Res. Exp. Med.* 185 : 399-405, 1985.
- 4) Watanabe A., Fujiwara M., Shiota T. et al. : Contents of neurotransmitter amino acids and the status of glutamic acid and GABA receptors in synaptosomes in various regions of the brains of acute hepatic failure rats. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 40 : 247-252, 1988.

## 最終講義

# 「ウイルス学」

庭 山 清八郎

富山医科薬科大学ウイルス学教室

ウイルスは自己複製のために十分な遺伝情報を含んでいる微生物の中で最も簡単で、かつ DNA か RNA の何れか一つのみで、宿主の性質により 3 種類、すなわち動物ウイルス、植物ウイルス、細菌ウイルス（バクテリオファージ）に分けられる。今回は動物ウイルス（DNA 型は 7 科、RNA 型は 12 科）の起源を中心に簡単に説明したいと思う。

### 生命とは

宇宙に存在する銀河星雲間の距離は広がりつつあるといわれるが、元は距離はもっと小さく直径 1 cm の塊だったと推定され、これがビッグバン（大爆発）により広大無辺な宇宙の誕生となったのは約百五十億年前のようで、地球が誕生したのは四十六億年前と考えられている。微惑星の衝突により発達しながら引力を大きくし、さらに激しい衝突を繰り返しながら地球として成長したらしい。微惑星中の気体が原始大気を水が原始海洋をつくったのは三十八億年前のようである。地球上に生命がどのようにして誕生したのかについては明らかでなく種々の説がある。生命が生まれたのは三十六億年前とされている（これに反対する説としてパンスペルミア説がある）。微生物としての証拠が岩石にみられるからであるが、いずれにせよ地球上での生命の起源についてオパーリン(1923)はつぎのように説明している。各種バクテリアを比較し、光合成を行う無機栄養の生物よりも有機物を栄養とするものの方が単純で、より原始的であり、生物のいない原始地球では長い間にはかなりの蓄積がなされたと考え、現在では緑色植物の出す酸素により酸化的となっている大気も原始地球では水素、メタン、アンモニアを多く含む還元の状態であった（生命をつくっている有機物は酸化的大気中では不安定）という説を出した。還元的原始地

球の原始的大気、海洋で無機物から簡単な有機物ができ、ついで複雑な有機物の生成、さらに、それらは重合してタンパク質などの高分子物質となり、集合してコロイド状態をつくり、周囲から区別される液滴（コアセルベート）を形成した。このコアセルベートにやがてメタボリズムのための酵素タンパク質や遺伝、自己増殖能力をもった核酸が取り込まれ、単細胞の原始生物の誕生となった。（この原始生物は核が未発達な現在みられるような微生物で、蓄積された有機物を嫌氣的に分解してエネルギーを得ていたとされている。この理論を裏づける実験として原始地球の大気の状態をまねて行ったミラーの放電実験が有名である。彼は原始大気は水素、メタン、アンモニア、水蒸気の混合体と想定し、小さな温池で 1 週間の火花放電の後集めた溶液を分析したところ、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸など数種のアミノ酸がみられたのである。この実験を契機に研究が進められた結果、その後 20 年間にほとんど全ての天然に存在するアミノ酸がつくられ、さらに核酸や ATP の一部であるアデニンははじめとする遺伝機構に必要なモノマー化合物のほとんどすべてができることが明らかとなった（アミノ酸 20 種、ヌクレオチド 4 種、グルコース、脂肪酸、リン酸、リボース、デオキシリボース各 1 種計 29 種のものが実験室内原始大気中で合成された）。

他方これに対しパンスペルミア説もある。宇宙にはそれほど高分子でなければ生命原料が沢山あることが知られてきた。かつて有機物の有りそうのない環境としては宇宙にただよう星間物質とされたが、1969 年ホルムアルデヒド、メタノールやシアン化水素など 11 個もの炭素化合物がみつかり、今後さらに増加する可能性が高いとされている。また 1970 年 12 月には宇宙からのレターといわれる隕石中にアミノ

酸が沢山確認されたが、1969年9月オーストラリアのビクトリア州マーチンソン附近に落下した隕石中にアミノ酸5種とタンパク質の原料とはなるが、現在地球上の生物体内で用を余りなさないアミノ酸11種が発見された(NASAのポナンペルマ化学研究所部長チーム)。これらのアミノ酸は地球上にみられないD型がL型とほぼ同量にみられたことに意味がある。地球上にL型のみということは、一度L型の生物が発生すると前の生物を全て食べてしまい現在地球上の生物は全てその子孫である。それには、①生命が誕生した砂漠の石英は光左旋性で、石英は生命誕生に吸着剤や触媒などの働きをしたかも知れない。②β線はある条件(制動放射)でγ線を出す、この電磁波がL偏光を示すのでその影響か、③アミノ酸にストロンチウムの放射線を浴びさせると、D型チロシンの方がL型より早くこわれる。④地球の自転でおこるコリオリの力による、⑤月からの反射光にL偏光成分が多い等が理由にあげられる。しかし何れにせよこれらのアミノ酸等により生命が生まれるチャンスは $10^{100}$ 以下、ほとんど0に近いと悲観的であるが、地球は生命を生むに最も適していたようで、at least-once phenomena でよいではないかというのが大方の意見である。

#### 微生物は微生物から(所謂自然発生説の否定)

そこで、話題を変えて自然発生説に関する点に入る。古代人でも人間の子供が母胎から鳥は卵から生まれることを疑わなかったが、多くの昆虫やハ虫類が泥の中から生まれると思った。ギリシャ神話の恋と美の女神アフロディテは海の泡から生まれ出たとの神話はさておき、あのアリストテレスもノミ、シラミ、ホタル、ウジ、カエルなどが腐った木や泥から生じると信じていた。中世になっても人々はガチョウやアヒルは海の貝から、ランの花からハトやコビトが、地中の動物体から花が咲くとか古代人に負らず荒唐無稽の説が信じられた。下って17世紀になってさえ、コムギと汗で汚れたシャツを壺の中に入れておくと21日目にハツカネズミが生まれ、親から生まれたネズミと少しも変らない(ヘルモント)とか、ニーダムのように肉汁を加熱し、密封したにもかかわらず、数日後微生物が充満していたことから、微生物の自然発生は証明されるとして生物体を

つくっている有機分子にはその生物の死後にも特別の生命力があると主張するものもあった。これに対し、スパンツアーニは容器、溶液、空気を長時間加熱し外気を完全に遮断さえすれば、微生物の発生は起り得ないので、ニーダムの実験は加熱が不十分であったのだと反対したことで有名となった。同じイタリアのレテイもウジの自然発生をモスリンの布で肉を覆うことにより否定している。これらの論議は1750年頃から始まり一世紀以上も続いた。近年に入り、フランスのルーアン博物館長で多くの学会名誉会員であったプージェさえも沸騰した湯の入ったフラスコを密封し、水銀槽中に開け、500mlの酸素と高温で長時間加熱した革の浸出液を入れれば、フラスコ中に生きた微生物の侵入性は全くないと考えたけれども、2〜3日目に微生物が生長してきたので、滅菌した腐敗性物質に空気を入れると、微生物は自然発生すると主張したのである。しかし、ここに恩師達の反対意見を押し切って敢然として立ち上った一人の学者があった。その名は正しくルイ・パスツールであった。彼は酵母抽出液と糖を含む溶液を入れ、開口部を細くしたフラスコ(有名な白鳥フラスコ)を加熱し、溶液中の微生物を殺すと同時に水蒸気で空気を追い出し、さらに、吹管を使用して開口部のガラスを溶かして封をし、調べに当っては注意深く長いハサミで首を切って空気の入ったのを確かめてから炎で封じ培養したが、そのほとんどは無菌状態であったのである。彼はこの実験結果をまとめて「空气中に存在する有機粒子に関する研究」という題で発表した。フランス学士院は1862年その功を賞し、アランベール賞を与えて支持したが、プーシェ派の反対にあったため1863年科学学士院で公開実験を行い反論した。これが世界的な反響を引きおこし、自然発生説は完膚なく否定されるに至った。この事と生命の誕生は全く違った次元であることはいうまでもない。

#### ウイルスの起源

ウイルス以外の微生物は代謝のための酵素系を有し、主として2分裂による増殖を行うのに対しウイルスは増殖に必要なエネルギー源やタンパク質合成機構に関する遺伝子群を全く有しておらず、所謂偏性細胞寄生性で全て宿主細胞に依存している。一旦

細胞外に出ると、路傍の石のように熱力学第二法則に従って崩壊の一途を辿るしかない。ウイルス粒子は自分自身の複製に最小限必要な遺伝子として核酸(1, 2本鎖 DNA, 1, 2本鎖 RNA)がタンパク質のカプシドに包まれた状態で(さらにその外側に脂質を含んだ外被を有するものもある)あるが、一旦細胞の内に侵入すると、宿主細胞内で増殖し、ウイルスがつくられる。従って、種の保存には感染によるほかはなく、宿主との間に特有の生態学的特徴を有する。

生命の誕生と同様明らかでなく仮説として提唱されているわけで、現在2つのことが考えられている。①彷徨える遺伝子ではなかろうかという考えであり、DNAの場合には元来細胞の中で遺伝子を構成しており、その一部が細胞本来のゲノムから遊離し、適当なタンパク質のカプシドを被って細胞から細胞へ伝播する彷徨える遺伝子である。RNAでは同様にカプシドを覆り細胞から細胞へ伝播するが、RNAとして自律合成の中心になることはできる。そのメカニズムはさておき、このような機構から誕生したものであろう。②ウイルスはある種の寄生生物の退行変性の産物ではないかという推測である。節足動物の細胞内には原虫や細菌など種々の微生物が寄生している。それらは寄生により退行変性が次第に進行すると、ついに1種類の核酸(DNAやRNA)だけを持ち、タンパク質、時に脂質に囲まれたものがつくられ、細胞の中で細胞の力を借りなければ増殖不能な実体として誕生したのである。

ビロイド、最近微小なビロイドという微生物が中枢神経系の進行性疾患(遅発ウイルス感染症)などに関連して注目されてきた。これはカプシドを持たないRNA(分子量100,000前後)で宿主細胞内に侵入し、RNA複製酵素を持たないにもかかわらず複製するもので、その機構は明らかではないが、ウイルスとしての形成の原始的な段階にあるものと考えられる。

ウイルスと宿主との進化上の関わり合い。

動物ウイルスには19科が知られ非常に多種多彩であるので、ここでは二・三のウイルスについてのみ説明する。

1) ヘルペスウイルス：このウイルスは魚類、両生類から霊長類まで広く脊椎動物に分布している。

サルや霊長類のヘルペスウイルスは非常に宿主域が広く、DNAのグアニン(G)とシトシン(C)の含量が極めて広い範囲にわたっていることから起源は非常に古い。そして宿主域を広げながら宿主の動物とともに進化してきたものと考えられる。

2) 麻疹ウイルス：ヒポクラテスの時代から知られ、このウイルスが今日まで存在しているのは人間社会(ヒトのみ感染)の中で生き続けたからで、それには人口構成が30~50万位であると、水平伝播による感染が進められ、種としての子孫の存続がゆるされる。

3) インフルエンザウイルス：A型ウイルスの宿主はヒト以外にウマ、ブタ、トリなどで、それぞれの間の感染環には不明の点が多く、何んとも云えないが、ヒトのみに限れば、B型を含め感染様式からして麻疹ウイルスとそうかけ離れたものとは思われない。

何れにせよウイルスの伝播力が強く、さらに致死率の高い病原ウイルスが出現すると、このウイルスは宿主を絶滅する恐れがあり、宿主もろとも淘汰されて種の保存もできなくなる。従って、現存するウイルスは病原性や伝播力が比較的弱く、宿主動物と一定の調和を保つことにより進化する事ができたと云えよう。感染には垂直感染というのがあるが、この感染様式はウイルスの種の保存に頗る好適である。前述のヘルペスウイルス科のサイトメガロウイルスはその傾向が強いが、毒性が強い。最近、発がん、エイズなどで世の注目を浴びてきたレトロウイルス科(ATL, HIV)などはその好例である。

5) レトロウイルス：このウイルスは数億年前脊椎動物が出はじめた頃プロウイルスのマスターキーができたと言われる。約6億年前多細胞動物が生まれ、酸素が地球上につくられるようになり現在のような大気層となり太陽からの紫外線が吸収されるようになり、生物は上陸するようになる。脊椎動物は2億7千万年前頃から上陸しはじめ、プロウイルスのマスターキーができたらしい。しかし、ヘビなどの爬虫類にもみつかることから、さらに3億年前、また海中の脊椎動物にも見え出されることになると、なお数億年前にできていたとも考えられる。レトロウイルスは脊椎動物とともに進

化したものであろうか。最初にタンパク質の遺伝情報、逆転写酵素の原型、DNA 合成酵素の遺伝情報が入り込む、マスターキーと逆転写酵素の進化がプロウイルスの型成の主役となり、レトロウイルスの粒子は偶然の働きにより数千万年前に誕生したが、水平感染や垂直感染しだしたのは1～2千万年前と思われる。ネズミ、ヒヒ、ギボン、ネコ間の水平・垂直感染が行われ、今日ヒトにその存在がみられている。

以上のように宿主動物とウイルスは相互に深い関わり合いを保ちながら、何回も何回も変化を起こしながら進化の歴史を重ねてきたものと考えられる。

### ウイルス研究の歩み

ウイルスはラテン語の *venom* という言葉に由来し、その意味は毒をあらわして、一時は感染症の病原因子をすべて包括した概念であった。1880年代パスツールやコッホらにより感染症の病原体が続々と発見、解明される中で、病巣からいかなる手段をへても病原因子を見い出すことができない特殊な感染症の存在が知られており、狂犬病のワクチンをつくり、予防や治療に天オ的業績をあげたパスツール自身すら全くその本体を認知し得ないまま、当時の概念としての微生物による感染としか推論の余地はなかったようである。1892年イワノウスキーによりタバコモザイク病の病原因子が細菌ろ過器を通過することが知られたが、彼もその本体については当時の通念から離れられなかった。その後1896年ベイジリンクが追試確認し、病原体は全く新しいものとして、それに接触感染をおこす液状生物(*contagium vivum fluidum*)と名付けた。これはある意味で大きさ?の認知からはじめられたが、概念的には明確性を欠くもので、液体の中に他の物質が混在しているのか(粒子状)、液そのものかを明確に指摘できなかったわけである。従って、つぎの考えとしては粒子性の確認と粒子であればその大きさと形状についての考

察がなされるのは当然の帰結であった。このようなことでその後の研究で大きさは20～400nm ときに600nm の範囲にある生物実体として確認され、形も正二十面体、らせん型など種々あることも知られるようになった。他方、今日のウイルス学進歩の端緒となったのはトウオルト(1915)やデレル(1917)らによるバクテリオファージの発見であった。細菌を宿主として増殖を示すことから生物の範疇に入るものとされ、増殖環が非常に短かく培養し易い細菌が宿主であることから盛んに実験がなされた。すなわち  $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  を用いて行われたハーシーやチェスらの業績、原子物理学者デルブリュックによる一段増殖試験等により性状が明らかにされ、微生物の中でウイルスは他と全く異なる実体として把握されると共に分類学実体としても確立された。バクテリオファージはDNA と極く微量のタンパク質のみが細菌体内に侵入して十数分後に子孫ウイルスが放出されることとか、コンラットのタバコモザイクウイルスの再構成に関する実験などを経て、ウイルスの増殖でその主役を果すものはDNA にしろRNA にしろ核酸であることが判明し、1940～1950年代にウイルス学が確立された。医学ウイルス学はレフレルによるウシ口蹄疫、リードによる黄熱の病原体が細菌ろ過器を通過するろ過性因子であることなど病原体の検索からはじめられたが、その経過と共に生化学的検索にも重点がおかれ、分子生物学的色彩をも濃厚にした。なお、組織培養の目覚しい進歩とともに、エンダースらのポリオウイルスの組織培養の成功がもたらされ、これを契機にアデノイド、扁桃腺の培養によるアデノウイルスの発見やエコー、コクサッキー、パラインフルエンザ、RS、ライノ、コロナなど続々と新ウイルスが分離され、ウイルス学の進展にみるべきものがあつた。現在も数多くの原因不明疾患にウイルスの関与している可能性が続々と明らかにされつつあり、今後ウイルス研究の進展に見るべきものがあろう。

## 原 著

### 非肥満ヒトII型糖尿病の動物モデルNONマウスの耐糖能異常の成因に関する研究

森岡 尚夫, 大角 誠治, 沢 丞, 矢野 三郎

富山医科薬科大学内科学第1教室

## The etiology of glucose intolerance in the NON mouse, an animal model of human non-obese NIDDM

Hisao MORIOKA, Seiji OHGAKU, Tasuku SAWA and Saburo YANO

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

Key words : NON mouse, animal model, NIDDM, insulin binding, glucose transport, proinsulin mRNA

### 要 旨

我々はヒトII型糖尿病に一般的に認められる特徴である末梢組織のインスリン抵抗性や膵B細胞の機能異常がNONマウスの耐糖能異常の成立にどの程度貢献しているかについて調べた。まず、末梢脂肪細胞受容体へのインスリン結合動態と、脂肪細胞への $^{14}\text{C}$ -D-glucoseの取り込みを指標としたインスリン作用から末梢でのインスリン抵抗性の有無を調べた。NONマウス及び対照ICRマウス由来の脂肪細胞に対するインスリン結合は、トレーサー濃度から100ng/mlまでほぼ同じ結合率であり、Scatchard解析(two site model)によって各脂肪細胞のレセプター数、結合親和性を求めても、ICRマウス $2.08 \times 10^5 \pm 5.80 \times 10^4/\text{cell}$ ,  $1.36 \times 10^{11} \pm 4.30 \times 10^{10}(\text{M}^{-1})$ (mean  $\pm$  SD,  $n=7$ ), NONマウス $1.96 \times 10^5 \pm 3.20 \times 10^4/\text{cell}$ ,  $1.42 \times 10^{11} \pm 7.10 \times 10^{10}(\text{M}^{-1})$ (mean  $\pm$  SD,  $n=8$ )といずれも差を認めなかった。他方、両種マウス脂肪細胞へのトレーサー濃度での $^{14}\text{C}$ -D-glucoseの糖取り込みは、インスリン最大刺激時(50ng/ml)で各々インスリン無添加時の約2倍まで増加し、インスリンのED<sub>50</sub>もICRマウスが6.8ng/ml, NONマウスが6.6ng/mlとほぼ同じであった。従って、両種マウス細胞でのインスリンの受容体への結合やそれに続く糖代謝の促進作用に有意の差はないと考えてよい。NONマウスの低インスリン血症と膵インスリン含量の低下から、NONマウスの膵B細胞の機能、特にインスリン合成能の異常が示唆されているので、膵のインスリンmRNA含量を調べた。その結果、NONマウスの膵総RNA画分中のインスリンmRNAの含量は、ICRマウスの33%と明らかに減少していた。

これらの観察結果は、NONマウスが示す耐糖能異常は末梢のインスリン抵抗性によると考えるより、むしろ転写の障害を含むインスリンmRNA代謝回転の異常が第一義的原因であることを示す。換言すれば、NONマウスにおいて膵B細胞の機能異常が、膵インスリン含量の低下、さらに低インスリン血症を引き起こし、その結果として耐糖能異常が観察されると判断された。

## はじめに

糖尿病はインスリンの作用不足に基づく糖や脂質の代謝異常を共通点とするが、この疾患の成因は多岐にわたる。糖尿病は、現在 WHO の勧告に従うと以下のように分類される<sup>1)</sup>。原因不明のものを生命を維持する上でインスリンが必須か否かという臨床的観点からインスリン依存型糖尿病(IDDM)とインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)に分け、NIDDMをさらに non-obese と obese に細分している。また原因が明らかなものを栄養不良関連性糖尿病(MRDM, 栄養状態の不良が原因)と other type (膵疾患、薬剤、内分泌疾患、異常インスリン血症が原因等)としている。また WHO では従来の病因論的分類の I 型、II 型糖尿病 (即ち、膵ランゲルハンス氏島の insulinitis 像や自己免疫の関与を示唆する I 型、及びそれらを伴わない II 型) の名称を、混乱を避けるため病因論的意味をもたせず、各々 IDDM (I 型)、NIDDM (II 型) と同義語として用いるように勧告している<sup>1)</sup>。原因が不明なものの中で I 型糖尿病の成因解明については、免疫学的アプローチにより次第に進展がみられているが<sup>2)</sup>、II 型糖尿病は濃厚な遺伝的背景が示唆され<sup>3, 4)</sup>、糖尿病患者の大部分を占めるにもかかわらず、成因は未だ不明である。従って、II 型糖尿病類似の症状を示す自然発症糖尿病動物モデルがあれば成因を解明するための有力な研究材料になるものと思われる。

我々が成因を研究していく上で着眼したのは、II 型糖尿病の膵 B 細胞機能である。膵 B 細胞よりインスリンが合成・分泌され、末梢標的細胞で作用を発揮するまで、どの段階の障害でも糖尿病は起こりうる。一方、II 型糖尿病のうち、肥満型と非肥満型では成因が異なるとされている<sup>5)</sup>。通常肥満 II 型糖尿病は、肥満による末梢脂肪組織でのインスリン抵抗性がまずおこり、それを代償するために高インスリン血症を伴ってくる。よって、肥満 II 型糖尿病ではインスリン合成の異常が第一義的病因とはなり得ない。これに対し、非肥満 II 型糖尿病患者の多くは空腹時血中インスリンレベルが、正常もしくは低下している。また、臨床的に耐糖能に全く異常が認められなくても、糖負荷時に膵 B 細胞のインスリン分泌反応が低下している“非糖尿病健常人”においては、

将来糖尿病を発症する危険性が高いとされ、このような一群の人々は“low insulin responder”として経過観察が必要とされている<sup>6, 7)</sup>。よって、ヒトの非肥満 II 型糖尿病患者はインスリン合成量が先天的に低下しており、これに後天的な因子が負荷され糖尿病の発症に至ると考えることができる。従ってこの型の糖尿病の発症機構を調べるために必要な動物モデルは、①糖尿病発症の主因は末梢組織におけるインスリン抵抗性ではない、②膵 B 細胞に病理組織学的な異常がない、という 2 点を満足しなければならない。この点に関しては、GK ラットやチャイニーズハムスターが非肥満 II 型糖尿病のモデル動物として既に報告されているが<sup>8)</sup>、これらの動物の膵ランゲルハンス氏島に病理変化が認められ、我々が必要とする動物モデルの条件を満たさない。

NON マウスは、I 型糖尿病の動物モデルとして NOD マウス株<sup>9, 10)</sup>を確立する過程で、同時に分離されたが、この系のマウスは、非肥満で耐糖能異常 (軽度の糖尿病) と、低インスリン血症があり、しかも膵ランゲルハンス氏島に病理学的異常を全く認めず、ヒトの非肥満 II 型糖尿病の特徴を多くもっているマウスであることを、我々が既に報告している<sup>11)</sup>。これらの点から、NON マウスを使ってその耐糖能異常を生じる機構を調べることは、ヒトの非肥満 II 型糖尿病の初期の病態とその発生機構の研究の最初のステップになりうるものと考えた。

ヒト非肥満 II 型糖尿病患者の主要な特徴は膵 B 細胞の機能異常と末梢組織でのインスリン抵抗性である<sup>12, 13)</sup>。今回我々は、NON マウスが示す耐糖能異常の成立にこの 2 つの因子のいずれが主要な役割を果たしているかを知る目的で、単離脂肪細胞のインスリン受容体へのインスリンの結合動態を調べた。また、一方で脂肪細胞への<sup>14</sup>C-D-glucose の取り込みのインスリンによる促進を指標としてインスリン作用を調べ、これらの検索により NON マウスの末梢標的細胞におけるインスリン抵抗性の有無を判定した。また NON マウスでは低インスリン血症と膵インスリン含量の低下が観察されることから<sup>11)</sup>、我々はインスリン合成過程の何らかの異常を推定している。この点を明らかにする目的で膵のインスリン mRNA 含量を調べ、膵 B 細胞機能の異常の有無についても検討した。

## 材料および方法

## 1) 実験動物

NON マウスは、これを純系化、確立したシオノギ研究所より搬入。また対照の Jcl-ICR マウスは、NON マウスの分離に使われた系である日本クレアのもをを購入した。いずれも 8~11 週令の雄マウスを使用した。

## 2) 材 料

豚の single component insulin は清水製薬より譲渡をうけ、牛血清アルブミン (Fraction V), N-Lauroylsarcosine, sodium salt は Sigma, collagenase は和光純薬, [U- $^{14}\text{C}$ ]-D-glucose は New England Nuclear, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP (137-141 TBp/mmol) は ICN-chemical, Guanidinium thiocyanate は Fluka, DNase I と DNA polymerase I は Pharmacia, ニトロセルロースフィルターは Schleicher & Schuell のものを用いた。 $^{125}\text{I}$ -monoiodo-insulin (豚, 3.7~5.6 MBq/ $\mu\text{g}$ ) は、滋賀医科大学の小林正博士がブタインスリンを Na [ $^{125}\text{I}$ ] を用いて Freychet ら<sup>14)</sup> のクロラミン変法にて標識したものを提供して頂いた。また、ラットプレプロインスリン I cDNA は、東北大学岡本 宏博士がクローニングされ、塩基配列が確認されたものを提供して頂いた (unpublished data)。

## 3) 緩衝液の作成

インスリン結合測定用の緩衝液として、Gambhir ら<sup>15)</sup> が至適条件を決定して、ヒト赤血球やラット脂肪細胞で良好なインスリン結合の結果が得られている Hepes-Tris 緩衝液 (HEPES 50mM, Tris 50mM, NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 2mM, 10mg/ml BSA, pH 8.0) を用い、糖取り込み測定用の緩衝液として、Whitesell ら<sup>16)</sup> が 3-O-methylglucose の取り込みにはじめて用い、以後糖取り込みで一般的に用いられる Krebs-Ringer Phosphate Hepes 緩衝液 (NaCl 131.2mM, KCl 4.71mM, CaCl<sub>2</sub> 2.47mM, MgSO<sub>4</sub> 1.24mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.48mM, HEPES 10mM, 10mg/ml BSA, pH 7.4) を用いた。

## 4) マウス脂肪細胞の単離

8~11 週令の雄マウスを屠殺後、すばやく開腹し、精巣上体上の fat pads より脂肪組織を細かく切り

落とし Rodbell の方法<sup>17)</sup> により Krebs-Ringer bi-carbonate buffer 中で 2mg/ml のコラゲナーゼ, 40 mg/ml の牛血清アルブミン (Fraction V) とともに 37°C, 20 分間振盪孵置し, 250 $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで濾過後, 緩衝液で 2 回洗浄し実験に供した。脂肪細胞数は, Hirsh と Gallian の方法<sup>18)</sup> に準じて, 蒸留水にとかした 2% osmium tetroxide 溶液中でアッセイ系に用いた単離脂肪細胞浮遊液を 24 時間, 室温にて固定後, コールターカウンターモデル ZB にて, その細胞数を計測した。

## 5) インスリン結合能の測定

単離脂肪細胞を Hepes-Tris 緩衝液にて希釈後プラスチックバイアル中で  $^{125}\text{I}$ -insulin (0.2ng/ml) と各種濃度の非標識インスリン (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml 最終濃度) とともに, 24°C, 90 分間孵置後, 各細胞浮遊液をシリコンオイル添加マイクロチューブに分取し, Beckmann microfuge で細胞層を分離し, この画分中の放射活性を  $\gamma$ -カウンターで測定した。なお, 測定値は 20 $\mu\text{g}$ /ml のインスリン存在下での結合を非特異的結合として差し引き, 脂肪細胞数  $2 \times 10^5$  個あたりに補正した。

## 6) 糖取り込みの測定

糖取り込みは柏木らによる方法<sup>19)</sup> にて検討した。単離脂肪細胞を Krebs-Ringer Phosphate Hepes 緩衝液で希釈し, 各種濃度のインスリン (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5, 50ng/ml) とともに, 37°C 30 分間前孵置後, 1.48KBq の  $^{14}\text{C}$ -D-glucose を加え, 37°C, 120 分間孵置した。シリコンオイルを加え細胞層を遠心分離し, 液体シンチレーションカウンターにて細胞への  $^{14}\text{C}$ -D-glucose の取り込みを測定した。インスリン濃度 0ng/ml で  $^{14}\text{C}$ -D-glucose を加えた直後に遠心分離した細胞層の測定値を非特異的取り込みとして差し引き, 総カウントのうち 1 秒間に細胞 1 個当たり加えたトレーサーがどれだけ取り込まれたかを glucose transport clearance (fl/s-cell) として表現した。

## 7) 総臓 RNA 画分の調製とインスリン mRNA の同定

マウスを屠殺後ただちに臓を摘出し, guanidinium thiocyanate 溶液中でポリトロンでホモゲナイズした。ついで 60°C 加温 phenol, phenol/chloroform 中で RNA を抽出した。(Guanidinium/Hot phenol



法)<sup>20)</sup>。水層の RNA をエタノール沈澱にて回収し、総 RNA を得た。アガロース電気泳動では総 RNA 量として  $5\mu\text{g}$  または  $10\mu\text{g}$  を使い、ラット B 細胞腫瘍より得た poly (A)<sup>+</sup> RNA を positive control, ラット肝 RNA を negative control とした。ニトロセルロースフィルターに固定後、Nick-translation により標識したラットプレプロインスリン I cDNA をプローブとしてマウスインスリン mRNA を検出し、インスリン mRNA の比較定量のために、そのオートラジオグラム上の陽性バンドに一致するフィルター部分を切り抜き、各々の  $^{32}\text{P}$  放射活性を測定した。

#### 8) 統計学的検定

測定値は、二元配置分散分析または、Student's t-test により検定した。

## 結 果

#### 1) インスリン結合

マウス単離脂肪細胞へのインスリン結合の結果を Fig. 1A に示した。NON マウス由来脂肪細胞へのインスリン結合は、 $0.2\text{ng/ml}$  のトレーサー濃度より  $100\text{ng/ml}$  までの各点において、コントロールの ICR マウスのそれに比して、有意差はなくほぼ同様の結合曲線を示した。

このインスリン結合の測定値を、Scatchard plot にて解析したのが、Fig. 1B である。さらに ICR マウスと NON マウスについて、インスリンレセプターの解析法の 1 つである two site model<sup>21)</sup> によりレセプター数 ( $R_0$ ) と結合親和性 ( $K_e$ ) を求めたところ、ICR マウスでは  $R_0 = 2.08 \times 10^5 \pm 5.80 \times 10^4/\text{cell}$ ,  $K_e = 1.36 \times 10^{11} \pm 4.30 \times 10^{10}(\text{M}^{-1})$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 7$ ) であり、NON マウスでも  $R_0 = 1.96 \times 10^5 \pm 3.20 \times 10^4/\text{cell}$ ,  $K_e = 1.42 \times 10^{11} \pm 7.10 \times 10^{10}(\text{M}^{-1})$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ ) とインスリンの受容体への結合性は両種マウス間で有意差を認めなかった。

#### 2) 糖取り込み

インスリンの糖取り込み促進作用の容量反応曲線を Fig. 2 に示す。インスリン無添加から  $1\text{ng/ml}$  のインスリン添加時まで NON マウス脂肪細胞が ICR マウスのそれに比べ、約 1.5 倍高い糖取り込みの活性を示し、この傾向はより高濃度のインスリンを加

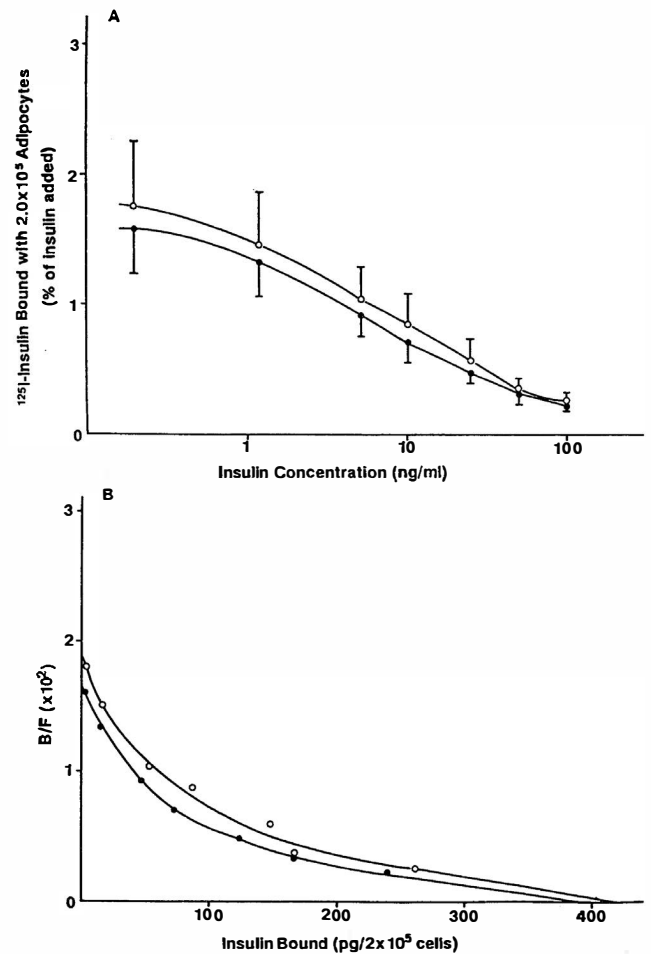


Fig. 1 A. Specific binding of  $^{125}\text{I}$ -insulin in the adipocytes of ICR ( $n = 7$ ,  $\bigcirc$ — $\bigcirc$ ) and NON ( $n = 8$ ,  $\bullet$ — $\bullet$ ) mice. Data represent the mean  $\pm$  SD. Cells were incubated for 90 min at  $24^\circ\text{C}$  with  $0.2\text{ng/ml}$   $^{125}\text{I}$ -insulin in the absence or presence of unlabeled insulin to give the total concentration indicated.

All data are corrected for nonspecific binding and are normalized to a cell concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml.

B. Scatchard plots of the insulin binding. Data from A are analyzed by two site model. The ratio of bound to free insulin (B/F) is plotted on the ordinate, and bound insulin is on the abscissa.

えても観察される。その結果に基づき LSD 法<sup>22)</sup> (Least Significant Difference) を用いて各インスリン濃度における有意差を検定すると、インスリン濃度が  $0\text{ng/ml}$  と  $0.3\text{ng/ml}$  の時の測定値では  $p < 0.05$  で有意差を認めた。一方、インスリン濃度  $50\text{ng/ml}$  における最大反応では統計学的検定を行うと、両種マウス細胞での糖取り込み活性には、有意差が

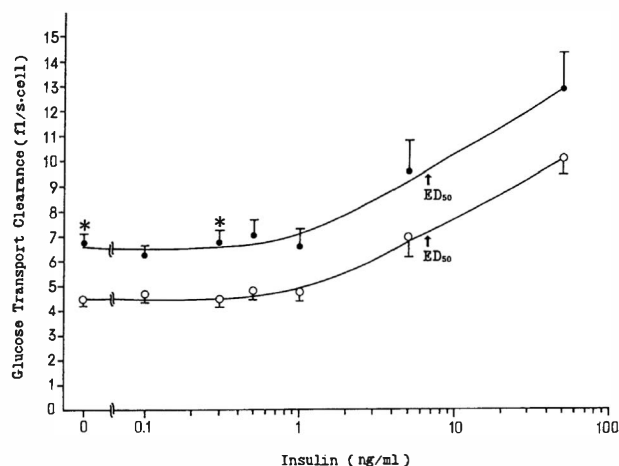


Fig. 2 Effect of various concentrations of insulin in glucose transport into adipocytes from ICR (○) and NON (●) mice. Values are the mean  $\pm$  SE of eight separate experiments. Values of NON mice are significantly different from those of ICR mice indicated by \* F-test  $p < 0.05$ . The  $ED_{50}$  of adipocytes from the ICR mice was 6.8 ng/ml, and that from NON mice was 6.6 ng/ml.

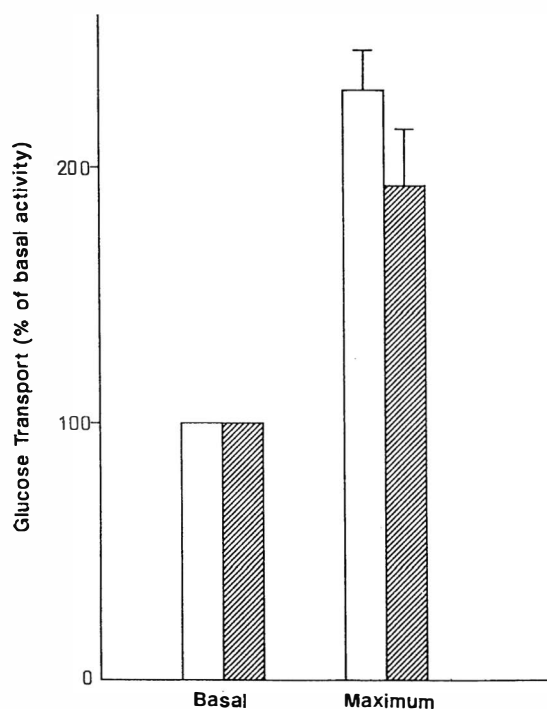


Fig. 3 Stimulation of glucose transport in the adipocytes from ICR (open bar) and NON (hatched bar) mice in the presence of 50 ng/ml insulin. Basal and maximum activities were measured with or without insulin. Values are the mean  $\pm$  SE ( $n = 8$ ) of the data from Fig. 2.

ない。また、各々のマウス細胞はインスリン無添加時に比べ、最大刺激時で約2倍程度、糖取り込み活性はインスリンにより促進された (Fig. 3)。この結果から、 $ED_{50}$  を求めると ICR マウスで 6.8 ng/ml, NON マウスで 6.6 ng/ml とほぼ同じ値であった。つまり、インスリンに対する諸種の反応性に関しては、両種マウス間で特筆する程の差がないことを意味する。

### 3) 膵におけるインスリン mRNA の定量

総膵 RNA は膵湿重量 1 mg あたり 8~12  $\mu$ g の収率で回収された。その一部を使って RNA プロットハイブリダイゼーションを行うと Fig. 4 に示したようにインスリンノーマ細胞に含まれる対照インスリン mRNA と同じ部位にあるバンドは、用いたマウスの中では、ICR に比べ NON マウスの方がいずれも弱い黒化度を示した。この結果から、NON マウス膵におけるインスリン mRNA 含量が対照に比し少ないことが示唆される。実際に、インスリン mRNA の陽性バンドのフィルター部分の  $^{32}$ P を計測すると Table 1 に示したように、NON マウスのインスリン mRNA 含量は、コントロールの ICR マウスのそれに比し、平均約 33% へと有意かつ著明な減少を認めた。

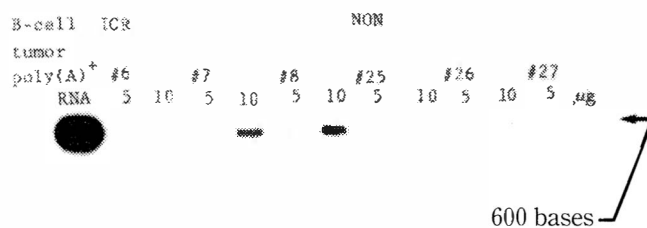


Fig. 4 Northern analysis for insulin mRNA in the pancreatic total RNA preparations from ICR and NON mice. Ten or five  $\mu$ g of the pancreatic RNA fractions from ICR mice (#6, 7, and 8) and NON mice (#25, 26, and 27) were subjected to Northern analysis using the nick-translated insulin cDNA. The total RNA from a strain of B cell tumor that synthesizes insulin is also examined at the same time to confirm occurrence of insulin mRNA.

Table 1. Comparison of proinsulin-mRNA contents per 10 $\mu$ g of total RNA, isolated from the pancreas of ICR and NON mice.

	ICR	NON
Number	5	6
Count (cpm) (Mean $\pm$ SE)	483 $\pm$ 67	160 $\pm$ 31 *
%	100	33(14~57)

\* p &lt; 0.01 by t-test

## 考 察

種々の原因があると考えられるII型糖尿病の成因を解明するためにその動物モデルを用いることができれば、糖尿病の成因研究にとって大きな意義がある。そこで、NON マウスの耐糖能異常の成立機序を明らかにすることにより、ヒト非肥満II型糖尿病の成因の少なくとも一つを推定できると考え、本研究を行った。

今回の研究結果より、NON マウスの末梢脂肪細胞の受容体のインスリン結合の性質や脂肪細胞への<sup>14</sup>C-D-glucoseの取り込みを指標としたインスリン作用については、対照のICR マウスとの間にNON マウスの耐糖能異常を説明しうるだけの有意の差を見い出せなかった。この事実はNON マウスの末梢脂肪細胞には検出できるほどのインスリン抵抗性が存在しないことを示唆する。

NON マウス脂肪細胞でのインスリン結合は、対照のICR マウスと有意差がなかった。しかし、ストレプトゾトシン投与で膵B細胞を傷害して作成した実験的糖尿病ラットの脂肪細胞では<sup>23)</sup>、低インスリン血症が原因となり、代償機能により脂肪細胞のインスリンレセプター数の増加(up regulation)が起こり、その結果インスリン結合量の増加が観察される。ただこの場合、脂肪細胞への2-deoxyglucoseの取り込みでみた糖尿病ラット細胞のインスリン作用は、著明に低下している。これに対して、<sup>14</sup>C-D-glucoseの取り込みでみたNON マウス細胞でのインスリン作用は対照のICR マウス細胞に比して有意差がなく、従ってNON マウスは、低インスリン血症を伴

うものの、日常の状態では脂肪細胞を含み、末梢細胞での代謝障害を起こしていないものと考えられた。

インスリン作用についてはトレーサー濃度の<sup>14</sup>C-D-glucoseを用いてマウス脂肪細胞への糖取り込みを検討した。ラットの脂肪細胞ではインスリン作用として糖の取り込みを検討するときには、2-deoxyglucoseの取り込み<sup>23)</sup>や、rapid pulse techniqueを用いて真の糖輸送を表わすとされる3-O-methylglucoseの取り込み<sup>16)</sup>が測定されることが多い。一方、マウスの脂肪細胞ではモルモットでの報告<sup>24)</sup>と同様に、ラットに比して糖輸送体の数が少ないためか、最大反応が低く、Youngら<sup>25)</sup>の報告でも2-deoxyglucoseの取り込みでインスリン最大刺激時でもインスリン濃度0ng/mlでの取り込みの2倍にも達していない。そこでさらに鋭敏な測定方法が望まれるわけであるが、マウスの脂肪細胞と同様、in vitroでのインスリンに対する糖取り込みの反応が低い例にヒトの脂肪細胞がある。この点を考慮し、インスリンによる糖取り込みの促進活性が低いヒト脂肪細胞を用いた実験系のために柏木らが開発した方法<sup>19)</sup>が、トレーサー濃度における<sup>14</sup>C-D-glucoseを用いた糖取り込みの測定法であり、我々はこの方法をマウスの脂肪細胞に応用した。インスリン最大刺激時でインスリン濃度0ng/mlでの糖取り込みの2倍位の反応が得られ(Figs. 2, 3)、マウス脂肪細胞のインスリン作用を検討するのに極めて有用な方法であると思われた。

ヒトの脂肪細胞での<sup>14</sup>C-D-glucoseを用いての糖取り込みの検討によると<sup>19)</sup>、肥満II型糖尿病患者では、インスリン最大刺激時(50ng/ml)の糖取り込みと、そのインスリンに対する感受性(ED<sub>50</sub>)が健常肥満者より低下するものもあることが報告されている。NON マウスでは、インスリン最大刺激時の糖取り込み、ED<sub>50</sub>ともに、コントロールのICR マウスと同様であった。これはNON マウスに末梢のインスリン抵抗性が存在しないことを示していると考えてよい。

II型糖尿病のもう一つの大きな要因である膵B細胞の機能異常について、我々はNON マウスで低インスリン血症と膵インスリン含量の低下傾向を既に観察していることから<sup>11)</sup>インスリン合成の異常を考え、膵のインスリン mRNAの定量によるインスリ

ン合成障害について検討した。NONマウスの膵のインスリン mRNA 含量はコントロールの ICR マウスより著しく低下しており、NONマウスにおいてインスリン遺伝子の転写からはじまるインスリン mRNA の代謝回転に異常があることが示唆された。しかし、インスリン mRNA レベルの低下が転写活性の低下によるのか mRNA 自身の分解促進によるのかについては、まだ結論が得られていない。次に、インスリン自身の合成の異常にも量の異常と質の異常がある。近年異常インスリンによる糖尿病症例が報告されているが<sup>26, 27, 28)</sup>、我々はこの点に関しても検討した。マウスインスリン I, II とアミノ酸配列が同一であるラットインスリン I, II を標準物質として NON マウスの膵から抽出したインスリンをヒトの異常インスリン中の 1 残基のアミノ酸置換を識別できる条件で HPLC にて分析したところ、NON マウスでは、マウスインスリン I, II に相当する 2 つのメインピークを認め、かつ、スタンダードのラットインスリン I, II とピークが一致した (unpublished)。よって、NON マウスが合成、分泌しているインスリンは正常マウスインスリンであると推定され、NON マウスの耐糖能異常が異常インスリン血症によるインスリン作用の活性低下によって起こる可能性は否定してよいと結論した。

膵のインスリン mRNA については、Giddings ら<sup>29, 30)</sup> による報告ではラットで絶食によって 18 時間で約 2/3 へ減少すること、また 3 日間絶食後、生理的食塩水静注群、ブドウ糖静注群、再摂食群でインスリン mRNA レベルを比較するとブドウ糖静注群で特異的にインスリン mRNA 量が増加している。このように膵のインスリン mRNA が、食事摂取とくにブドウ糖によって大きく変動することが示されているが、我々の実験でのマウスは自由摂食でありこのような食事摂取の制限による影響は除外しうると考えられた。

糖尿病と膵のインスリン mRNA 量との相関については、ストレプトゾトシン処理ラット<sup>31)</sup>や膵切除ラット<sup>32)</sup>での報告があり、いずれも耐糖能異常と膵のインスリン mRNA 含量の低下が相関することを明らかにしているが、両者ともに膵臓への直接的傷害によって耐糖能異常を誘発しており、この点で NON マウスと同一に論じることはいえない。一方、

他の自然発症糖尿病動物モデルの膵のインスリン mRNA 含量についての報告はなく、これらのモデル動物については今後のさらなる検討が必要と思われる。

膵 B 細胞からのインスリン分泌は in vivo でグルコースおよびアルギニン投与の刺激に反応して起こる。このインスリン分泌の不全もヒト II 型糖尿病に共通して認められる特徴である。一般にこの病型の患者ではグルコース刺激によるインスリンの初期分泌 (第 1 相) が低下消失したり<sup>33)</sup>、さらには後期分泌 (第 2 相) も低下する。しかし、アルギニンによる刺激に対しては十分反応する。この点に関して NON マウスでは狩野ら<sup>34)</sup>が単離ランゲルハンス氏島を用いた灌流実験で、ブドウ糖刺激によるインスリン分泌の第 1 相が消失し、アルギニン刺激に対するインスリン分泌が保たれていることを明らかにしており、この点も NON マウスの II 型糖尿病動物モデルとしての適切な特徴の 1 つといえよう。

今回我々は NON マウスが示す耐糖能異常は、末梢のインスリン抵抗性によると考えるより、むしろインスリン遺伝子から転写された mRNA の代謝回転の障害によりインスリン mRNA 含量が低下し、このことが既に明らかにしてきた膵インスリン含量の低下を起こす可能性が強いことを示唆した。さらに我々はこの結果起こる低インスリン血症が、NON マウスの耐糖能異常の成立に主要な役割を果たしている可能性が強いと考えている。このように NON マウス膵 B 細胞には明らかに機能の異常が発見されたが、インスリン分泌との関連を考えると、インスリン含量の低いことがグルコース刺激による第一相の低下を起こしているかも知れないし、あるいはインスリン分泌に至る血中グルコース濃度の膜を介してのシグナル伝達も B 細胞で障害されているのかも知れない。NON マウスでインスリン mRNA の翻訳がグルコースにより十分促進されているかどうかは現在不明である。しかし、既に述べたように膵のインスリン mRNA レベルが低下するという特定の原因に基づく糖尿病動物モデルの存在は、ヒト II 型糖尿病の病態や成因の解明に貢献するものと期待される。

ラットプレプロインスリン I cDNA を提供して頂きました東北大学医学部第 1 医化学・岡本宏教授, <sup>125</sup>I-insulin を提供して頂きました滋賀医科大学第 3 内科・小林正講師に深く感謝致します。

なお, 本研究の一部は文部省科学研究費 (一般 C, No. 60570524) によった。

## 文 献

- 1) World Health Organization, Report of a WHO Study Group. Technical Report Series **727**. Geneva : WHO, 1985.
- 2) Todd J. A., Bell J. I. and McDevitt H. O. : HLA-DQ $\beta$  gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* **329** : 599–604, 1987.
- 3) Barnett A. H., Eff C., Leslie R. D. G. and Pyke D. A. : Diabetes in identical twins. *Diabetologia* **20** : 87–93, 1981.
- 4) Knowler W. C., Pettitt D. J., Savage P. J. and Bennett P. H. : Diabetes incidence in Pima Indians. *Am. J. Epidemiol.* **113** : 144–156, 1981.
- 5) National Diabetes Data Group : Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* **28** : 1039–1057, 1979.
- 6) Cerasi E. and Luft R. : “What is inherited — what is added” hypothesis for the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes* **16** : 615–627, 1967.
- 7) Kosaka K., Hagura R. and Kuzuya T. : Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes. *Diabetes* **26** : 944–952, 1977.
- 8) Mordes J. P. and Rossini A. A. : Animal models of diabetes mellitus. In : Joslin’s Diabetes Mellitus (Marble, A., Krall, L. P., Bradley, R. F., Christlieb, A. R., Soeldner, J. S. eds.) : 110–137. Lea & Febiger, Philadelphia, 1985.
- 9) Makino S., Kunimoto K., Muraoka Y., et al. : Breeding of a nonobese, diabetic strain of mice. *Exp. Anim.* **29** : 1–13, 1980.
- 10) Tochino Y. : Discovery and breeding of the NOD mouse. In : Insulinitis and Type I Diabetes (Tarui S. Tochino Y. NonaKa K. eds.) : 3–10. Tokyo : Academic Press, Japan, 1986.
- 11) 大角誠治, 森岡尚夫, 沢 丞ほか : ヒト II 型糖尿病の新しい動物モデル, NON マウスの研究. *糖尿病動物* **1** : 162–167, 1987.
- 12) De Fronzo R. A., Ferrannini E. and Koivisto V. : New concepts in the pathogenesis and treatment of noninsulin dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **74** : 52–81, 1983.
- 13) Reaven G. M., Berstein R., Davis B. and Olefsky J. M. : Non-ketotic diabetes mellitus : Insulin deficiency or insulin resistance ? *Am. J. Med.* **60** : 80–88, 1976.
- 14) Freychet P., Roth J. and Neville D. M., Jr. : Monoiodoinsulin : Demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43** : 400–408, 1971.
- 15) Gambhir K. K., Archer J. A. and Bradley C. J. : Characteristics of human erythrocyte insulin receptors. *Diabetes* **27** : 701–708, 1978.
- 16) Whitesell R. R. and Gliemann J. : Kinetic parameters of transport of 3-O-methylglucose and glucose in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **254** : 5276–5283, 1979.
- 17) Rodbell M. : Metabolism of isolated fat cells I : Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239** : 375–380, 1964.
- 18) Hirsch J. and Gallian E. : Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J. Lipid. Res.* **9** : 115–119, 1968.
- 19) Kashiwagi A., Verso M. A., Andrews J., et al. : In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with non-

- insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **72** : 1246–1254, 1983.
- 20) Maniatis T. : Extraction, purification and analysis of mRNA from eukaryotic cells. In : *Molecular Cloning* (Maniatis, T. ed.) : 188–209. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 21) 小林 正 : インスリンレセプターの測定法. *Diabetes Journal* **10** : 128–131, 1982.
- 22) スネデカー, コ克蘭 : 統計的方法。(畑村又好, 奥野忠一, 津村善郎共訳) : 293–295. 岩波書店, 東京, 1972.
- 23) Kobayashi M. and Olefsky J. M. : Effects of streptozotocin-induced diabetes on insulin binding, glucose transport, and intracellular glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Diabetes* **28** : 87–95, 1979.
- 24) Horuk R., Rodbell M., Cushman S. W. and Wardzala L. J. : Proposed mechanism of insulin-resistant glucose transport in the isolated guinea pig adipocyte. *J. Biol. Chem.* **258** : 7425–7429, 1983.
- 25) Young P., King L. and Cawthorne M. A. : Increased insulin binding and glucose transport in white adipocytes isolated from C57BL/6 ob/ob mice treated with the thermogenic  $\beta$ -adrenoceptor agonist BRL 26830. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **133** : 457–461, 1985.
- 26) Kwok S. C. M., Steiner D. F., Rubenstein A. H. and Tager H. S. : Identification of a point mutation in the human insulin gene giving rise to a structurally abnormal insulin (Insulin Chicago). *Diabetes* **32** : 872–875, 1983.
- 27) Haneda M., Chan S. J., Kwok S. C. M., et al. : Studies on mutant insulin genes : Identification and sequence analysis of a gene encoding [Ser<sup>B24</sup>]insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 6366–6370, 1983.
- 28) Nanjo K., Sanke T., Miyano M., et al. : Diabetes due to secretion of a structurally abnormal insulin (Insulin Wakayama). *J. Clin. Invest.* **77** : 514–519, 1986.
- 29) Giddings S. J., Chirgwin J. and Permutt M. A. : The effects of fasting and feeding on preproinsulin messenger RNA in rats. *J. Clin. Invest.* **67** : 952–960, 1981.
- 30) Giddings S. J., Chirgwin J. and Permutt M. A. : Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes* **31** : 624–629, 1982.
- 31) Permutt M. A., Kakita K., Malinas P., et al. : An in vivo analysis of pancreatic protein and insulin biosynthesis in a rat model for non-insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **73** : 1344–1350, 1984.
- 32) Orland M. J., Chun R. and Permutt M. A. : Modulation of proinsulin messenger RNA after partial pancreatectomy in rats. *J. Clin. Invest.* **75** : 2047–2055, 1985.
- 33) Pfeifer M. A., Halter J. B. and Porte D. : Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **70** : 579–588, 1981.
- 34) Kano Y. : Insulin secretion in NOD and NON mouse. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* **97** : 295–308, 1988.

## 原 著

# 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による癌患者血清および 肺癌気管支洗浄液中蛋白分画に関する臨床的研究

西出 良一\*, 龍村 俊樹\*\*, 村上 新\*, 小山 信二\*

富山医科薬科大学外科学第1教室\*, 附属病院救急部\*\*

## HPLC quantitation of cancer specific serum fraction in malignancies and in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients

Ryoichi NISHIDE\*, Toshiki TATSUMURA\*\*, Arata MURAKAMI\*,  
Shinji KOYAMA\*

First Department of Surgery\*, Faculty of Medicine, Emergency Department of University Hospital\*\*;  
Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

Key words : high performance liquid chromatography, tumor marker, lung cancer, bronchoalveolar  
lavage fluid, glycoprotein

### 要 旨

悪性腫瘍105例（肺癌73，胃癌15，乳癌8，ほか9），良性腫瘍20例，心血管疾患等28例，および健常者40例の計193例の血清を HPLC（カラム TSKgelG2000sw）を用いて分析し，retention time 34分において特徴ある低分子量物質（分子量6,000～8,000）を得た。本物質は従来腫瘍マーカーとして見出されている CEA や AFP，および急性相蛋白と総称されている血清糖蛋白とは異なる新しい物質であって，悪性腫瘍群では，他群，および健常者に較べて有意 ( $p<0.001$ ) に高値を示した。悪性腫瘍群での陽性率は70.4%で，とくに肺癌患者についてみた場合，従来報告されている他の如何なる腫瘍マーカーよりも高い鑑別能を示した。これは肺癌患者の患側気管支洗浄液の HPLC 測定によっても有意性 ( $p<0.05$ ) が裏付けられた。さらに RT34 分画上昇例では PHA，Con A 等の細胞性免疫能の指標が低下していることも示され，RT34 分画は腫瘍免疫機作にも関わりをもつ癌関連物質であることが推測された。

### はじめに

私どもは，さきに血中の糖蛋白分画中の fucose 値を癌，非癌疾患患者，及び正常人について分析検討し，その測定値の上昇が癌の診断，病期の進行程度，さらに予後の評価，ならびに治療効果等の判定上，有用なパラメーターになることを認め報告し

た<sup>1,2)</sup>。

今回，最近の発達した蛋白分析技術である高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography：以下 HPLC）を用いて，癌患者血清蛋白分画を分析し，癌関連分画を見いだすとともに，その分画の臨床応用を可能にすることを目的として検討を試みた。

## 対 象

## 1. 血清蛋白の分析

対象は、富山医科薬科大学第一外科において1981年5月から1989年10月の入院患者中、低栄養、肝障害、腎障害、重度炎症を認めなかった悪性腫瘍患者105例、良性腫瘍患者20例(肺8例、甲状腺5例、乳腺3例、大腸2例、肝臓1例、耳下腺1例)、心臓血管疾患患者28例(心臓弁膜疾患5例、虚血性心疾患2例、大動脈瘤11例、閉塞性動脈硬化症8例、閉塞性血栓性血管炎2例)、および対照として健康な成人40名(健常者)を選んだ(表1)。

## 2. 気管支洗浄液中の蛋白の分析

上記のうち、肺癌患者で片側にのみ病変を認め、検体を採取し得た10例(平均年齢61.6歳、男性7例、女性3例)を対象に行った。病期別には stage I 4例、stage II, stage III, stage IV 各2例で、組織型別では腺癌5例、扁平上皮癌3例、小細胞癌1例、腺扁平上皮癌1例であった。

## 方 法

## 1. 血清蛋白の分析

1) 採血は早朝空腹時に肘静脈より抗凝固剤を加えることなく行い、3,000回転15分間遠心後、血清を分離し、フィルター(孔径0.45 $\mu$ m)で濾過した。なお、保存を要する場合には-40℃で凍結し、解凍後速やかに分析に供した。

血清は、低分子量物質の分離能が良く、その至適分子量が $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ とされている TSKgelG-2000SW(7.5mm $\times$ 600mm)(TOSO, 東京)分析用カラムを用いて、HPLC(655A-11 高速液体クロマトグラフ, 655A-21 型波長可変型 UV モニター, 655-61 プロセッサー A)(日立製作所, 東京)にて解析を行った。溶離液としては、0.2M リン酸緩衝液(pH6.9) + 0.2M NaCl を用い、流速は0.7ml/min に設定し、血清の注入量は7 $\mu$ l とし、UV モニターによる検出波長を254nm に設定して、チャートスピード5nm/min として吸光度測定を行い、プロセッサーに内蔵された積分器により、分画面積値を算出した。

TSKgelG2000SW カラムで分析したクロマトグラムは、低分子量分画に注目して行ったので、保持時

表1 HPLC 法(TSKgelG2000SW)による血清蛋白分析を行なった対象

	件数	年齢(歳, 平均)	男:女
悪 性 腫 瘍	105	22-82(63.3)	67:38
肺 癌	73	22-82(63.6)	50:23
胃 癌	15	41-76(61.9)	11:4
乳 癌	8	52-75(61.6)	0:8
食 道 癌	4	58-69(65.3)	4:0
大 腸 癌	3	61-72(68.4)	2:1
甲状腺癌	2	50-74(62.0)	0:2
良 性 腫 瘍	20	19-66(45.6)	12:8
心臓血管疾患	28	23-79(62.0)	20:8
健 常 者	40	19-62(46.8)	20:20
計	193	19-82(57.9)	119:74

間(retention time: 以下 RT) 30分から50分までの分画を統計学的検討の対象として、その測定値を次式を用いて換算し検討を行った。

$$RT_x/RT_{30-50} \times 100(\%) \quad (RT_x: RT_x \text{ 分の分画面積, } RT_{30-50}: RT_{30 \text{ から } RT_{50} \text{ 分までの分画面積の総和)})$$

群間の平均値の差の検定は、分散分析後、t 検定を行い、危険率(p)が0.05未満を有意とした。

2) 注目する分画の分子量を推測するため、分子量が既知の精製標準蛋白の RT の測定を HPLC 法にて同様に行った。用いた標準蛋白は、 $\gamma$ -globulin (分子量160,000), bovine serum albumin(67,000), ovalbumin (43,000),  $\beta$ -lactoglobulin (36,000), myoglobin (17,000) である。

## 2. 気管支洗浄液中の蛋白の分析

肺癌患者の気管支鏡検査の観察終了後に、腫瘍が占拠する肺葉気管支(患側)、および対側肺の肺葉気管支(対側)へ、生食水20mlを活入洗浄した後、吸引回収したものを、1,000回転5分間遠心し、上清を分離した。その1mlを取り、Freeze Dryer Modulyo EF-4(エドワード, イギリス)にて凍結乾燥し



た後、蒸留水 200 $\mu$ l で溶解し、フィルター(孔径 0.45 nm) で濾過し、そのうちの 7 $\mu$ l を HPLC 法で同様に測定した。患側と対側のそれぞれより得られた気管支洗浄液中の各分画値について、血清の場合と同様にして統計学的検討を行った。なお、これらの症例については、いずれも血清蛋白分画の測定を併施して、気管支洗浄液の測定値との関係を検討した。

### 3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

癌患者血清中の HPLC 法で有意に上昇した分画(RT34 分画)を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(以下 SDS-PAGE)を行った。

ULTRACENT-30 (TOSO, 東京)にて、分子量 3 万以上の物質を排除した血清 10ml を凍結乾燥し、蒸留水 200 $\mu$ l で溶解したものを、フィルター(孔径 0.45nm)で濾過し、そのうちの 20 $\mu$ l を同じ条件で HPLC に注入し、Fraction Collector FRAC-100 (Pharmacia, スウェーデン)にて RT34 分画の溶出した部分を抽出し、この操作を 50 回繰り返して、その抽出液を凍結乾燥した後、蒸留水 1ml で溶解して試料とした。15% SDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲルサイズ 16 $\times$ 16, 厚さ 1.0mm)を作製し、試料 10 $\mu$ l を測定に用い、Protein II 165-1802 (BIO-RAD, アメリカ)を用いて、25mA で 4 時間通電し泳動を行った。また、サイズ排除を行っていない全血清、および精製標準蛋白を同時に泳動した。ここで用いた標準蛋白は、bovine serum albumin (分子量 67,000), ovalbumin (43,000), chymotrypsinogen A (25,000), ribonuclease A (13,700) である。泳動後、Merril らの方法<sup>3)</sup>にしたがって銀染色を行い、Dual wavelength TLC Scanner CS930, Data Recorder DR-2(島津製作所, 東京)を用いて 530nm と 660nm との 2 波長法により吸光度の測定を行った。

## 結 果

### 1. 血清蛋白の分析

1) TSKgelG2000SW を用いて血清を分析したところ、図 1 の様な分画パターンを示した。検討の結果 RT30~50 分の間にみられた分画中、RT34 分の分画(以下 RT34 分画)は、悪性腫瘍で  $8.23 \pm 4.75\%$ 、良性腫瘍で  $2.14 \pm 2.18\%$ 、心血管疾患で  $2.68 \pm 2.31\%$ 、健常者で  $2.50 \pm 1.36\%$  の分画比で、悪性腫

瘍のみが有意( $p < 0.001$ )に高値を示し(表 2)、他の分画においては、有意差は認めなかった。また RT-34 分画比は、各悪性腫瘍の間に有意差は認められなかった。

健常者について、年齢別・性別にみた RT34 分画比の検討においては、いずれも有意差は認められなかった(表 3)。

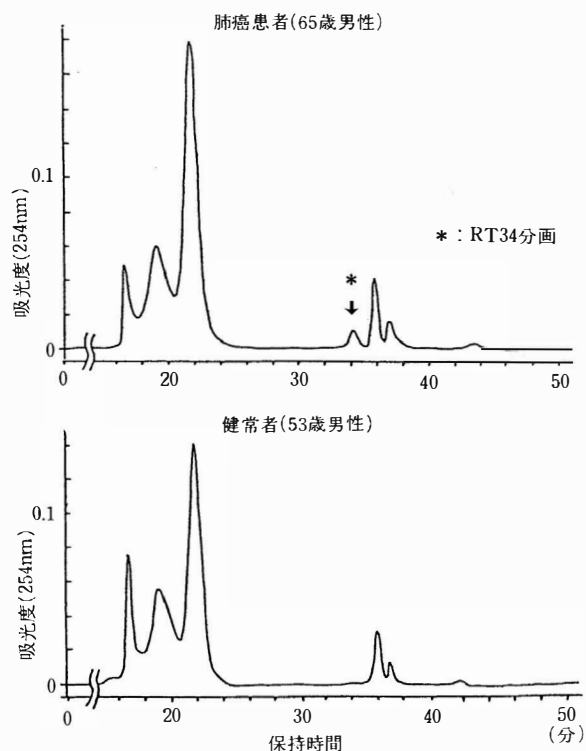


図1. HPLC(TSKgelG2000SW)による血清蛋白分画測定例

表2. 血清 RT34 分画比

	例数	RT34 分画比(%)	
悪 性 腫 瘍	105	$8.23 \pm 4.75$	* * *
肺 癌	73	$8.22 \pm 4.92$	
胃 癌	15	$7.08 \pm 2.80$	
乳 癌	8	$7.06 \pm 2.18$	
食 道 癌	4	$11.37 \pm 5.10$	
大 腸 癌	3	$11.80 \pm 5.45$	
甲状腺癌	2	$10.26 \pm 2.37$	
良 性 腫 瘍	20	$2.14 \pm 2.18$	]
心臓血管疾患	28	$2.68 \pm 2.31$	
健 常 者	40	$2.50 \pm 1.36$	

\*  $p < 0.001$

表3. 健常者における性別, 年齢別の血清 RT34 分画比

	例数	RT34 分画比 (%)
男 性	20	2.57±1.54
女 性	20	2.44±1.30
19-30才	13	2.31±1.39
31才-50才	14	2.64±1.21
51才以上	13	2.15±1.39
計	40	2.50±1.37

本検査における cut off 値を健常者の値の mean + 2SD より, 6.0%に設定し, 6.0%以上を陽性とする。悪性腫瘍での陽性率は70.5%を示すのに対して, 良性腫瘍では10.0%, 心血管疾患では 3.6%, 健常者では 0%となり, 本分画は癌血清診断上, 有用であることが示された(図2)。なお悪性腫瘍以外で陽性となった3例は, 肝血管腫, 甲状腺腺腫, 腹部大動脈瘤であった。

さらに肺癌73例の病期別の RT34 分画比は, stage

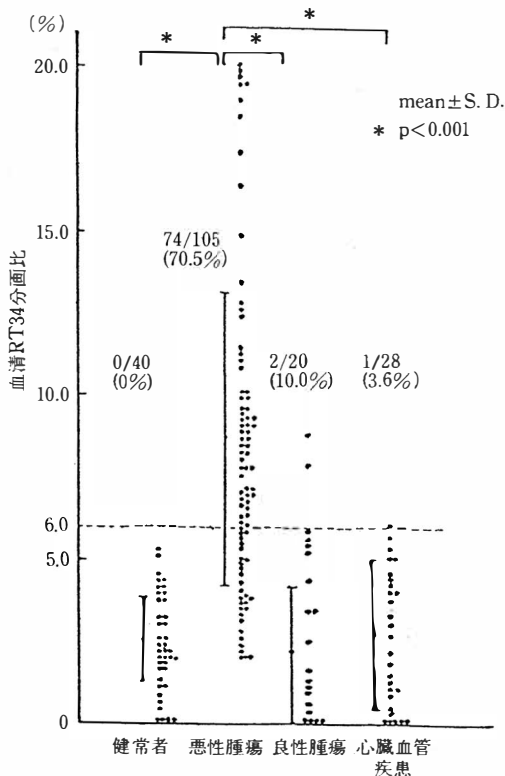


図2. 各疾患における血清 RT34 分画比と陽性率 (cut off 値: 6.0)

I が  $6.17 \pm 3.00\%$ , stage II が  $6.28 \pm 2.76\%$ , stage III が  $7.84 \pm 4.64\%$ , stage IV が  $10.44 \pm 5.67\%$  と, 病期の進行にともなって上昇することを認めた(図3)。また, 陽性率も, stage I は45.0%, stage II は50.0%, stage III は65.0%, stage IV は77.8%と病期の進行にともなって上昇がみられた。

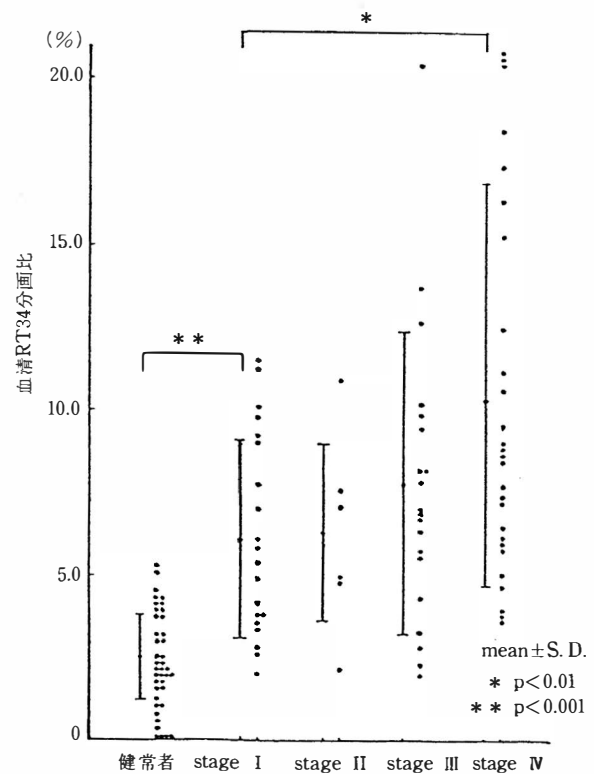


図3. 肺癌における病期別の血清 RT34 の分画比

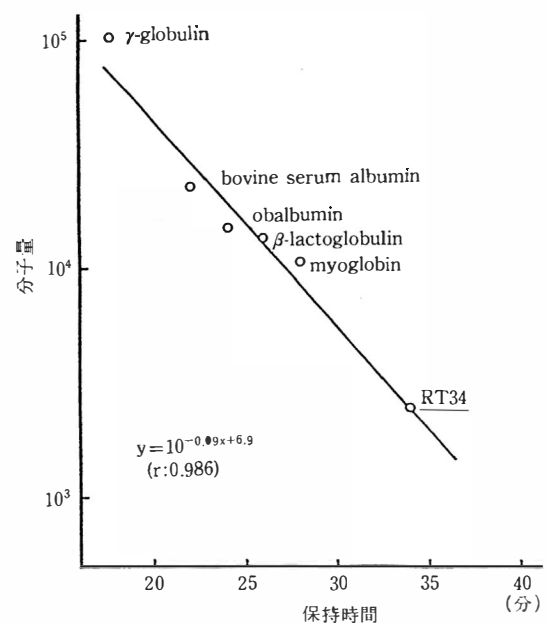


図4. 血清 RT34 分画の分子量の推定

組織型別にみると、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、腺扁平上皮癌、大細胞癌の順に高い値を示したが、有意差は認められなかった（表4）。

2) TSKgelG2000SW を用いた分子量既知の5種類の精製標準蛋白の保持時間の測定により、RT34分画の分子量の推定を行った。片対数グラフでそれら標準蛋白の分子量をY軸、保持時間をX軸にとって相関を見ると、一次相関を示すことが明かにされ（図4）、分子量(y)と保持時間(x)とは

$$y = 10^{-0.09x+6.9}$$

の相関式で表わされる（相関係数 = r: 0.986）。そこ

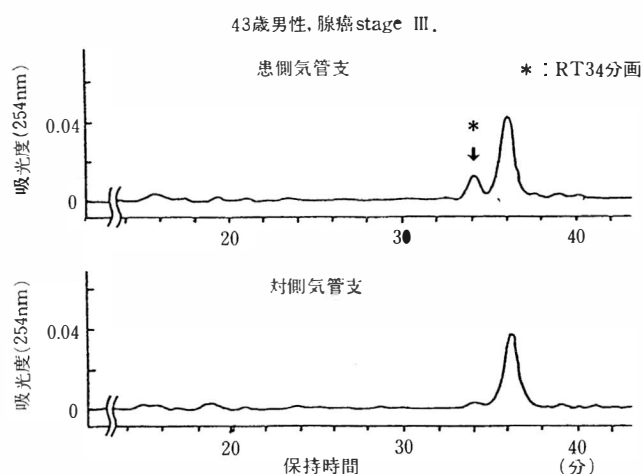


図5. HPLC(TSKgelG2000SWによる肺癌患者の気管支洗浄液中の蛋白分画測定例

表4. 肺癌の病期別、組織型別陽性率および血清 RT34 分画比

	陽性率(%)	RT34分画比(%)	
stage I	9/20(45.0)	6.17±3.00	*
stage II	3/6(50.0)	6.28±2.76	
stage III	13/20(65.0)	7.84±4.64	
stage IV	21/27(77.8)	10.44±5.67	
腺癌	20/33(60.6)	8.45±2.80	
扁平上皮癌	16/22(72.7)	10.06±5.54	
小細胞癌	2/4(50.0)	8.05±0.24	
腺扁平上皮癌	2/4(50.0)	6.82±1.65	
大細胞癌	2/3(66.7)	6.05±1.85	

\* p<0.01

で  $x = 34.0$  により分子量を推定すると、この RT34 分画は分子量が 6,900 の物質から成ることが判明した。

## 2. 気管支洗浄液中の蛋白分画

気管支洗浄液の HPLC 泳動パターンは、血清のものと幾分異なり、RT において30分未満では、ほとんど分画を指摘できなかった。しかし、RT34 分以上においては、血清パターンと類似しており（図5）、患側気管支と対側気管支とのそれぞれから採取した洗浄液について、血清と同様に比較検討した。RT34 分画比は、患側気管支から採取したものは  $6.53 \pm 4.81\%$ 、対側気管支から採取したものは  $2.28 \pm 2.05\%$  と、患側において有意 ( $p < 0.05$ ) に高値を示した。

さらに患側と対側の気管支洗浄液 RT34 分画比と血清 RT34 分画比との相関関係を検討した結果、患側の RT34 分画比において相関係数 0.74 で有意 ( $p < 0.05$ ) の相関を示した（図6）。

## 3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法

血清より HPLC で分離し抽出した RT34 分画を SDS-PAGE で泳動した後、銀染色を行ったところ、図のように分子量 1 万以下の領域に銀染色により染色されるバンドが認められた（図7）。

## 考 察

癌患者の血清蛋白分画は、健常者の蛋白分画と異なることが注目され、Snyder<sup>4)</sup>は、癌患者において、hemopexin,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, ceruloplasmin,  $\alpha_1$ -antitrypsin の増量を報告した。さらに、癌患者のスクリーニング、予後推定に血清糖蛋白値の測定が有用であるとしている報告も多い<sup>5,6)</sup>。当教室においても、Tatsumura ら<sup>1,2)</sup>が糖蛋白分画中の fucose 値が担癌生体において有意に上昇することを他に先駆けて報告している。さらに村上ら<sup>7)</sup>は、癌及び非癌者の血清蛋白分画を HPLC 法（カラム TSKgelG3000SW を用いて測定し、担癌患者血清中の分子量 1 万前後と推定される分画に興味深い結果をえた。そこで今回は、TSKgelG3000SW カラムよりも至適分子量が低く、注目する分画の分子量レベルに適した。TSKgelG2000SW カラムを用いてさらに検討を行った。

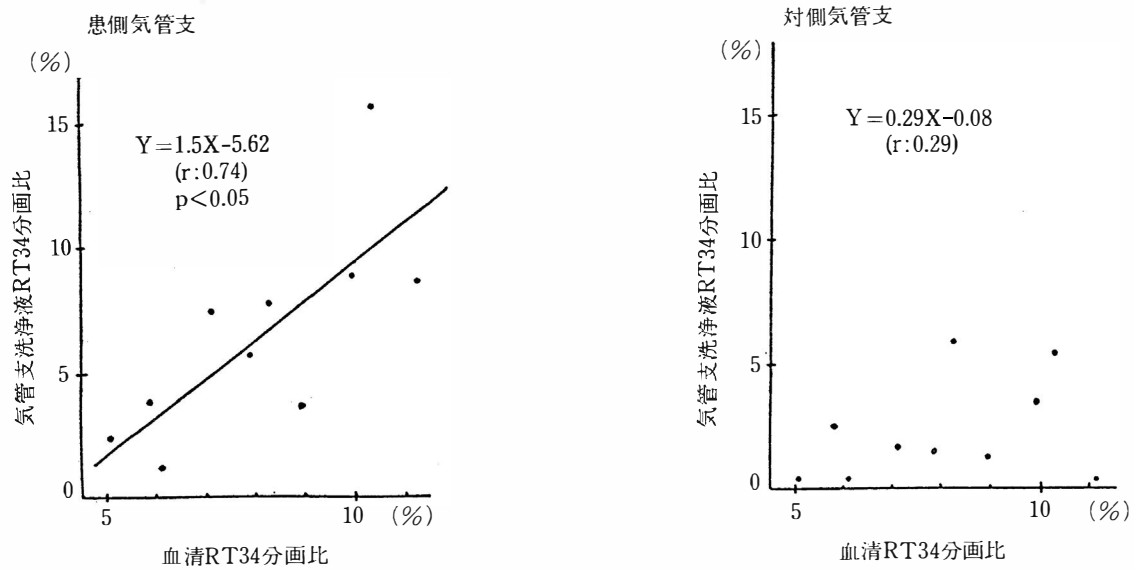


図6. 肺癌患者における血清 RT34 分画比と気管支洗浄液 RT34 分画比との相関

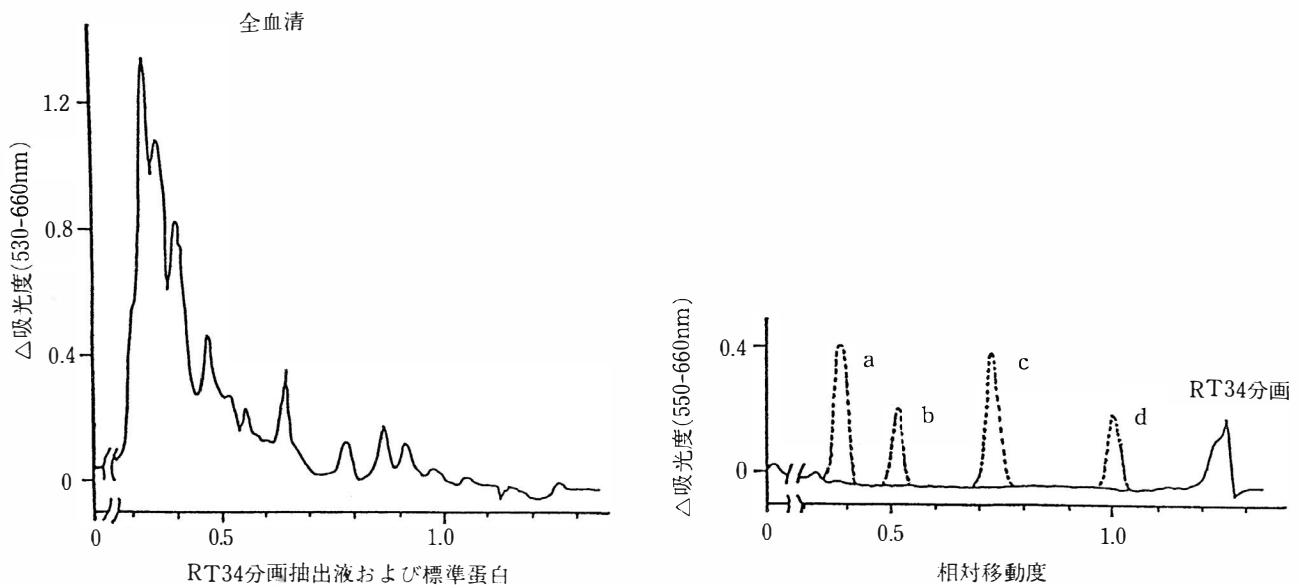


図7. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法(銀染色)による全血清, RT34 分画の抽出液, および標準蛋白の分画パターン  
a: bovine serum albumin (分子量67,000), b: ovalbumin (43,000),  
c: chymotrypsinogen A (25,000), d: ribonuclease A (13,700).

癌患者血清における血清蛋白の変動の機序としては、①癌細胞由来の刺激により、主として肝での蛋白の産生が促進され血中へ流出する、②癌細胞の増殖によるその産生蛋白が血中へ流出する、③腫瘍組織の崩壊、④腫瘍発育に伴う周囲結合組織成分の破壊などがあげられている。現在のところ、①の説を支持するものが多い。しかし、実際、細胞膜糖蛋

白、および糖脂質の性状は細胞の癌化に伴って変化することが知られており<sup>8,9)</sup>、また、細胞培養の発達とともに、癌細胞から種々の蛋白が産生されていることが明らかになってきた。腫瘍細胞の産生する諸物質の中から、ペプチド性で細胞の増殖促進に働く因子として種々の transforming growth factor (TGF) が分離されている。TGF は正常線維芽細胞

に腫瘍細胞の増殖特性を発現させる活性を持ち、腫瘍細胞自身の増殖に関与している可能性も持っている。TGF が、担癌ヌードマウスおよび癌患者の尿中に特異的に排出されることから、腫瘍マーカーとなりうる可能性もあるとされ<sup>10)</sup>、またその分子量は、約 6,000 のものから 55,000 のものまで報告されている。TGF をはじめいくつかの growth factor が、今回我々が測定の対象とした分子量範囲内に含まれており、RT34 分画との関連が興味深いところである。

一方、最近では血清のみならず、他の体液、例えば肺癌患者の気管支洗浄液なども生化学的診断に利用されている。Iglehart ら<sup>11)</sup>は、気管支洗浄液中の immunoglobulin A が、肺癌において有意に上昇することを指摘し、肺癌の診断に有用であると報告している。また、藤井ら<sup>12)</sup>は、肺癌患者の気管支洗浄液中の CEA の高値は肺癌組織の局所産生 CEA を反映したものであり、その測定が末梢型肺癌の鑑別診断に有用であると報告している。我々が行った気管支洗浄液中の RT34 分画の検討では、患側気管支において RT34 分画比が高値を示し、さらに患側気管支洗浄液の RT34 分画比が血清 RT34 分画比と相関を示した。したがって、RT34 分画が腫瘍細胞、もしくはその周辺から産生あるいは流出している可能性が示唆された。しかし、検体の採取方法、つまり洗浄液の量、洗浄気管支の選択、患者の呼吸状態による洗浄範囲の適否、気管支内腔への腫瘍の進展の程度といった問題もあり、今後なお検討究明すべき課題も残されている。

さらに、担癌患者の血清蛋白組成の変化と癌に対する免疫機構との関連も注目されてきている。癌患者血清中に増量する或種の蛋白が免疫抑制の因子として考えられており、この面からも血清蛋白測定の意義は大きい。Cooperband ら<sup>13)</sup>は、 $\alpha$ -globulin 中より免疫抑制因子を抽出し、immunoregulatory  $\alpha$ -globulin (IRA) と名付け、また、宮地<sup>14)</sup>は担癌生体において、PHA によるリンパ球幼若化能と PHA 皮内反応とを測定し、それらと  $\alpha_1$ -acid glycoprotein,  $\alpha_1$ -antitrypsin との間に逆相関があることを立証し、IRA に類似の免疫抑制能を血清蛋白が有していると報告している。

今回の成績では、悪性腫瘍患者血清中の RT34 分

画比が良性腫瘍、心臓血管疾患、および健常者に比べて有意 ( $p < 0.001$ ) に上昇することを認め、また各悪性腫瘍の間に有意差の無いことから、RT34 分画は非臓器特異的癌関連物質であることが推測された。さらに cut off 値を設定することにより、その陽性率が悪性腫瘍で明らかに高いことが示され、肺癌における検討でも癌の進行にともなう RT34 分画比および陽性率の上昇が認められ、HPLC による RT34 分画測定が癌血清診断において有用なパラメーターとなることが示された。

RT34 分画の分子量は 6,900 と推測されるが、これは過去報告されている腫瘍マーカーや糖蛋白に比べてかなり低分子量であり、我々の得た新しい知見と考えている。今後さらに研究を継続し、growth factor や免疫機構などの問題を含め、RT34 分画の化学的、生物学的性質についてその詳細を明らかにしてゆきたい。

## 結 語

1. 血清蛋白分画を HPLC 法にて分析検討した結果、血清 RT34 分画は悪性腫瘍において、良性腫瘍、心臓血管疾患、および健常者に比べて、有意に高値を示した。また、陽性率も悪性腫瘍において高値を示し、RT34 分画は癌血清診断上、有用であることが示された。
2. 肺癌について検討したところ、病期の進行にともなう血清 RT34 分画比の上昇と陽性率の上昇が認められた。組織型による差は認められなかった。
3. 肺癌患者の患側気管支と対側気管支とのそれぞれから採取した洗浄液の RT34 分画比を比較したところ、患側において有意に高値を示し、さらに患側の洗浄液 RT34 分画比は、その血清 RT34 分画比の上昇と相関を示し、RT34 分画は腫瘍細胞、あるいはその周辺から産生あるいは流出している可能性が示唆された。
4. HPLC および SDS-PAGE による精製標準蛋白との比較測定の結果、RT34 分画は分子量 6,900 の高分子ポリペプチドと推定された。

稿を終わるにあたって、血清等の採取に協力下さった教室各主治医、並びに測定に多大の労を賜った大西治美、国谷佳子、伊藤博子の各技師に感謝するとともに、ご助言、ご指導を賜わった矢野三郎、渡辺明治両教授に深謝する。

## 文 献

- 1) Lambana S. : Clinical value of protein-bound fucose in patients with carcinoma and other diseases. *Gann* **67** : 379-388, 1976.
- 2) Tatsumura T., Sato H., Komori Y., Yamamoto K., Fukatani G. and Kuno S. : Clinical significance of fucose level in glycoprotein fraction of serum in patients with malignant tumors. *Cancer Res.* **37** : 4101-4103, 1977.
- 3) Merrill C. R., Goldman D., Sedman S. A. and Ebert M. H. : Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211** : 1437-1438, 1981.
- 4) Snyder S. and Ashwell G. : Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy. *Clin. Chem. Acta* **34** : 449-455, 1971.
- 5) Grindulis K. A., Forster P. J. G., Hubball S. and McConkey B. : Can acute phase reactants distinguish benign and malignant disease of the upper gut? *Clin. Oncol.* **7** : 345-350, 1981.
- 6) 森田耕一郎, 小田達郎, 毛利 平 : 肺癌患者における血清糖蛋白値. *肺癌* **24** : 721-726, 1984.
- 7) 村上 新, 龍村俊樹, 清水岑雄, 森田直賢 : 癌生体における血清蛋白分画の異同に関する研究—高性能液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography) を用いた, ヒト血清蛋白の分析とその臨床的意義— *金大十全医誌* **96** : 575-586, 1987.
- 8) Tatsumura T., Ariga T., Yu R. K. and Sartorelli A. C. : Changes in glycosphingolipids accompanying the differentiation of human squamous SQCC/Y1 cells. *Cancer Res.* **48** : 2121-2124, 1988.
- 9) 古川 清, 寺山 宏 : 細胞膜の複合蛋白の構造と生物学機能. *日本臨床* **43** : 681-686, 1985.
- 10) 平井玲子, 山岡和子 : TGF (腫瘍化増殖因子). *細胞培養* **13** : 150-155, 1987.
- 11) Iglehart J. D., Warzynski M. J. S., Montelaro R. C., Bolognesi D. P., Sabiston D. C. and Wolfe, W. G. : Function of the secretory immune system in bronchogenic carcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **82** : 63-69, 1981.
- 12) 藤井昌史, 木浦勝行, 亀井治人, 畝川芳彦 : 末梢肺癌における気管支肺胞洗浄液中 CEA, SCC, NSE の検討. *日胸疾会誌* **27** : 452-455, 1989.
- 13) Cooperband S. R., Badger A. M., Davis R. C., Schmid K. and Mannick J. A. : The effect of immunoregulatory  $\alpha$  globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* **109** : 154-163, 1972.
- 14) 宮地洋二 : 癌手術適応決定のための免疫学的指標に関する研究. *名市大医誌* **28** : 554-584, 1977.

## 松田健史先生を偲んで



医学部解剖学（第一）教授 松田健史先生は、本学付属病院に入院加療中のところ、主治医団やご家族に見守られながら平成元年9月27日午後3時20分御逝去されました。享年63歳でした。ここに謹んで哀悼の意を表します。

松田先生は大正15年1月30日東京でお生まれになり、旧制武蔵高校から金沢医科大学（現金沢大学医学部）へ進まれ、昭和23年に御卒業になりました。東京大学医学部付属病院などで臨床経験をつまれた後、昭和28年に金沢大学医学部解剖学教室助手に、昭和30年には同助教授におなりになりました。また、昭和51年、本学の開学と同時に解剖学教授として着任されました。昭和51年～55年には本学評議員、昭和62年～平成元年には本学付属図書館長としてその管理運営に貢献されました。

松田先生の教育分野における御貢献には誠に大きなものがあります。開学当初より長期的展望に立った解剖体の収集確保を重要課題とされ、多くの会議の合間をぬって平松 博前学長(故人)、小林 収前副学長（現富山医科薬科大学名誉教授）とともに献体キャンペーンを実施され、地域に対し献体思想の普及に努められました。また、医学教育に献体思想を導くべく積極的に取り組まれました。このように先生の精力的な御努力により、解剖実習は昭和52年の第1回では学生100人に対し10遺体であったものが、昭和55年以降の実習では学生4人に対し1遺体で実習を行えるほどになりました。

先生の御研究の分野は金沢大学在職当初において形質人類学的研究（推測統計の導入によるデータ

処理など）と細胞学的研究（核様物質の溶血染色など）です。金沢大学医学部助教授に昇進されてからNIHの研究員として研鑽された臨床遺伝学の成果は本学に着任後も引き続けられました。近年は後進の教育にも大変熱心に取り組み、リンパ管、胸膜、心膜並びに腹膜の研究を御指導なさいました。

以上のように、先生の御研究は形質解剖学を主とすると共に、遺伝学領域に於て大きな進展を見ました。昆虫類の新種「マツダマダラバエ」の発見、リーガー症候群の家系と遺伝様式の解明などが特筆に値する業績であり、これに対して昭和54年富山新聞文化賞が授与されました。

また、先生は遺伝相談のエキスパート養成、さらには富山県内の遺伝相談ネットワークの敷設にも尽力されました。富山県先天異常問題協議会委員として地域医療対策に貢献され、その御活躍は大変多岐にわたっています。

学会活動の主なものとしては、日本解剖学会（S37—）、日本人類遺伝学会（S44—）、臨床遺伝学会（S54—）、富山医科薬科大学医学会（S54—）の各評議員をつとめられたことが挙げられます。

第14回成長談話会大会（S57.10）、日本解剖学会第44回中部地方会（S59.10）および第9回臨床遺伝研究会（S60.6）を会長として主宰され、第29回日本人類遺伝学会（S59.11）は副会長をおつとめになり、いずれも好評を博しました。また、本誌の母体となっている富山医科薬科大学医学会の発展にも意欲的に取り組み、昭和54年から同62年までの8年の長きにわたり同会副会長をおつとめになったのは私どもの記憶に新しいところであります。

先生の長年にわたる研究業績や、教育、地域医療、卒後教育等多くのご功績に対し平成元年10月28日に正四位勲三等旭日中綬章が授与されました。

平成元年11月18日には本学体育館に於て医学部葬が厳粛に執り行われました。

故人の御遺徳を偲ぶとともに、学内外から多数の御会葬を得ましたことを教室員一同、改めて深く感謝する次第です。（文責 森沢佐歳）

## 第23回～26回 富山医科薬科大学医学会学術集会(題名)

### 第23回 特別講演 平成元年 7 月14日(火) (平成元年度後期臨床実習夏期補講に併催)

「脳死をめぐる諸問題」

杏林大学医学部脳神経外科教授 竹 内 一 夫  
司会 麻酔科 伊 藤 祐 輔

### 第24回 平成元年12月 2 日(土) (第 6 回富山医科薬科大学医学会総会に併催)

#### 第 1 部 シンポジウム 「腫瘍マーカーの再評価と将来展望」

司会 第 1 内科 矢 野 三 郎  
第 2 生化 藤 岡 基 二

#### I 基礎的立場から

##### 1. HPLC 法を用いた血清蛋白成分中の癌関連分画の検討

第 1 外科 西 出 良 一

##### 2. 乳癌における癌遺伝子産物の免疫組織学的検討

第 2 外科 田 内 克 典

#### II 臨床的立場から

##### 3. 肺癌における 5 種腫瘍マーカー測定の意味

第 1 内科 水 島 豊

##### 4. 多変量解析システムの肺癌診断への応用

第 3 内科 斉 藤 清 二

##### 5. 前立腺癌における各腫瘍マーカー測定の意味

泌尿器科 布 施 秀 樹

##### 6. 婦人科領域における腫瘍マーカーの現況

—— とくに CA125 について ——

産科婦人科 新 居 隆

#### 第 2 部 就任講演

「肝性脳症の病態と治療」—— 潜在性脳症を中心に ——

第 3 内科 教授 渡 辺 明 治  
司会 附属病院長 佐々木 博

### 第25回 最終講義 平成 2 年 1 月30日(月)

「ウイルス学」

ウイルス 教授 庭 山 清八朗  
司会 細菌・免疫 小 西 健 一

### 第26回 平成 2 年 3 月 2 日(金) (第 4 回富山医科薬科大学電子顕微鏡懇話会に併催)

#### 1. 特別講演

「Cellular sites of actions of steroid hormones ; Use of autoradiography  
for their identification」



## 2. 一般講演

1. Application of radioisotope-labeled lipid microspheres as a drug delivery system—where are microspheres found in EM?  
RI Laboratory Honda T.
2. The elemental composition of cell organelles as studied by X-ray microanalysis using fresh frozen dried ultrathin sections.  
Anatomy 2 Takaya K. and Ishikuro T.
3. Transformation of transplantable Mastomys' gastric cartinoid cells into rhabdomyocytes.  
Surgery 2 Karaki Y. and Sawataishi M.
4. Ultrastructures of experimental thymoma.  
Surgery 1 Sugiyama S., Takano T. and Wang Y.
5. Ultrastructural study on secretory glycoconjugates of pancreatic cancer cells.  
Internal Medicine 3 Nishimura N., Kubota Y., Saito S., Inoue K. and Watanabe A.
6. The reaction of sera from patients with mixed connective tissue disease with acid phosphatase positive phagocytes in the red pulp of the murine spleen.  
Internal Medicine 1\*, Anatomy 2\*\* Kamitani T\*, Yano S\*. and Takaya K\*\*.
7. Immunocytochemical study of S-100 protein positive adherent cells obtained from human tonsils.  
Pathology 2\* Oral and Maxillo-Facial Surgery\*\*, Japanese Oriental Medicine\*\*\*  
Kawaguti M\*, Ishizawa S\*, Shimoda F\*\*\*, Okabe H\*\*, Sakai T\*\* and Koizumi F\*.
8. Findings in pericardial pore formation.  
Anatomy 1 Fukuo Y.
9. Scanning electron microscopic study of pili torti (twisted hairs).  
Dermatology Maruyama T., Kanei A., Takahashi S. and Morohashi M.

## 第3回 富山医科薬科大学電子顕微鏡懇話会(題名)

日時：平成元年 9 月12日(火)

### 特別講演

メチル水銀による口蓋裂の誘発とその機序

熊本大学医学部解剖学第3講座教授 藤 本 十四秋

## 第 4 回 富山医科薬科大学電子顕微鏡懇話会(抄録)

日時：平成 2 年 3 月 2 日(金)

会場：附属病院臨床第二講義室

### 特別講演

#### Cellular sites of action of steroid hormones : Use of autoradiography for their identification

Walter E. STUMPF

Department of Cell Biology and Anatomy, University of  
North Carolina, Chapel Hill, NC, U. S. A.

Autoradiographic studies with radiolabeled steroid hormones have provided information on sites of action, which were difficult to identify by disruptive biochemical approaches. Due to the high sensitivity of the autoradiographic method and the possibility to study relatively intact tissues, information on individual target cells within the topographical context has been obtained. Thus, such data have expanded our knowledge base for estradiol, progesterone, testosterone, and adrenal steroids. In recent years, extensive new information became available on vitamin D metabolites, demonstrating nuclear receptor sites for 1, 25-dihydroxycholecalciferol in many tissues that include B-cells of the endocrine pancreas to promote insulin secretion ; TSH-cells in the anterior pituitary to promote TSH secretion ; gastrin-producing cells in the antrum of the stomach ; cells of the adrenal medulla, both epinephrine and nor-epinephrine producing cell types ; atrial cardiomyocytes, colocalized with atrial natriuretic factor (ANF), probably to influence the secretion of ANF ; cells in the epidermis and hair sheaths to promote cell proliferation and differentiation (as subsequently shown by Dr. Suba at Showa University) ; Sertoli cells of the testis ;

certain cells in the epididymis and prostate ; germinal epithelium of the ovary ; certain cells in the oviduct ; ductal and acinar epithelium in the mammary gland ; chief cells in the parathyroid ; reticular cells in the thymus and spleen, as well as certain macrophages in lymph nodes and spleen ; myoepithelial cells in salivary glands ; and neurons in brain, spinal cord, and spinal ganglia.

While some of the functions of the new target tissues have been clarified, much work will be necessary in order to learn about the functions of vitamin D at the newly identified sites of genomic action. Of a particular challenge are the many sites described in the brain. In the brain, vitamin D receptor neurons are seen especially in the central nucleus of the amygdala and in the bed nucleus of the stria terminalis, in the reticular nucleus of the thalamus, in the periventricular nucleus of the hypothalamus, in the piriform cortex, in area CA4 of the hippocampus, in the raphe nucleus of the midbrain, and in motor nuclei of cranial nerves. The topographic distribution of vitamin D target cells in the central nervous system suggests that vitamin D is involved in the regulation of all neural functions that include autonomic, neuroendocrine, sensory, and motor activities.

From the new information derived from the autoradiographic studies and the present knowledge about related functions, it can be stated that vitamin D is a steroid hormone (not a vitamin !) that has extensive influences on select target cell populations throughout the body. In

its actions and distribution, vitamin D resembles estradiol and other steroid hormones. Vitamin D, which we call more appropriately SOLTRIOL (Stumpf, 1988), is the steroid hormone of sunlight. With the seasonal rise and fall of soltrial blood levels, the activities of all vital systems in the body are regulated and adjusted to the seasonal environment in order to assure maintenance of life, with optimal seasonal adaptation of growth and reproduction. Accordingly, vitamin D-soltrial is involved not only in the regulation of calcium levels, as was believed for a long time, but also in the regulation of reproduction, thyroid function, carbohydrate metabolism, immune response, mental processes, cardiovascular function, and the entrainment of biorhythms.

#### 一般講演

##### 1. Application of radioisotope-labeled lipid microspheres as a drug delivery system——where are microspheres found in EM ?

Takashi HONDA

Radioisotope Laboratory, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Artificial lipid microspheres (LM-0.2 $\mu$ m in average diameter) containing  $^{14}$ C-palmitic acid labeled triglycerides were injected intravenously into rats of the carrageenan paw edema tests. LM in the inflamed paw skin was observed to be approximately 2 to 3 times higher localized than that in the non-inflamed skin.

With the electron microscope, LM were found to be diffused into exudate in inflamed rat paw. Electron micrographs of the inflamed tissue showed that the endothelial cells of blood vessels contained LM and that LM penetrated from basement membrane to outer layer of the vessels and localized in the inflamed tissues. Many LM were taken up by macrophages.

Therefore, the results of the electron microscopy study support the pharmacokinetic findings on tissue distribution of LM, and provide additional evidence for uptake in endothelial cells, and macrophages and for penetration into extravascular exudate.

##### 2. The elemental composition of cell organelles as studied by X-ray microanalysis using fresh frozen dried ultrathin sections

Kenichi TAKAYA and Tutomu ISHIKURO

Department of Anatomy, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Myelin of several vertebrates was studied by a quantitative X-ray microanalysis using fresh frozen dried ultrathin sections. The mesencephalon of a dog and a cat, the cerebral cortex of rats and the spinal cord of tree frog tadpoles were freshly frozen in freon precooled with liquid nitrogen. Ultrathin sections (100nm) were attached on the titanium grids treated with collodion and freeze-dried in nitrogen gas flow. The sections were firstly observed by 200 kV electron microscopy and then microanalyzed with the analytical electron microscope (X-650) on the STEM mode at an acceleration voltage of 40 kV, a specimen current of 2nA and counting time of 100s. A quantitation was made by the P/B ratio method and the concentration was expressed as mM/kg dry weight. The standard solutions were prepared by dissolving compounds of 16 elements including sodium, magnesium, aluminum, silicon, phosphorus, sulfur, chloride, potassium, calcium, manganese, iron, chromium, nickel, copper, zinc and barium in 20% polyvinylpyrrolidone (PVP-K30). The myelin sheath and the surrounded axon were well preserved and identified clearly. However, laminated figures of the myelin sheath were not discernible even

at a high magnification. High amounts of phosphorus and potassium were disclosed in myelin but they showed a great variation among the regions of the brain. Phosphorus, 408 mM/kg dry weight and potassium, 408 mM/kg were disclosed in the dog myelin and phosphorus, 380 and potassium, 256 in the cat myelin, respectively. A higher concentration of phosphorus was detected in nuclear regions than in myelin.

### 3. Transformation of transplantable Mastomys' gastric carcinoid cells into rhabdomyocytes

Yoshiaki KARAKI and Masaru SAWATAISHI  
Second Department of Surgery, Toyama Medical and Pharmaceutical University.

We have successfully maintained transplantable Mastomys' carcinoid in the subcutaneous region of the thigh of recipient mastomys; the original tumor was spontaneously produced in the Mastomys' glandular stomach of the Niigata strain. To clarify the relationship between stromal tissue especially, capsular structure and component cells of this particular neoplasm, histologic, histochemical and electron-microscopic studies were undertaken. Tissues were taken from the transplants of the 15th generation of the Niigata strain. Histologically and histochemically, tumors were usually surrounded by loose connective tissue or so-called pseudocapsule containing some kinds of stromal cells. These capsular stromal tissues often have a continuity to the intraneoplastic stromal tissue dividing it into several neoplastic islands or nests. In these capsular stromal tissues and nearby stroma adjacent to the peripheral neoplastic nests of the main tumor mass, typical rhabdomyocytes were frequently seen. Electron-microscopically the capsular structure was in some part composed of elongate rhabdomyocytes. In some neoplastic

nests nearby the capsular structure and stroma around the nests, immature, transitional or mature type of rhabdomyocytes were frequently observed. Furthermore, some of the immature cells possessed both myofibrils with z band and endocrine granules. These findings strongly suggest that Mastomys' gastric carcinoid cells in transplants have a possibility of being transformed into rhabdomyocytes resulting in making a capsule of the tumor.

### 4. Ultrastructures of experimental thymoma

Shigeki SUGIYAMA, Toru TAKANO and Yang WANG

First Department of Surgery Toyama Medical and Pharmaceutical University

The fine structures of human and experimental thymoma and various carcinomas have been documented. We have observed a spontaneous thymoma in Buffalo rats, 12 months old. An attempt was made to obtain the thymoma in a short exposure to N-nitroso-N-methylurea(NMU) combined with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine(BHT). The electron microscopic study of the induced tumors was made.

Twenty four newborn mice were divided into two groups. Group 1 : A single high dose of NMU (600mg/kg) was administered subcutaneously in ten mice. Group 2 : A single high dose of NMU combined with total seven injections of BHT (250mg/kg per time) in 14 mice. The animals were maintained at room temperature(22°C) and given food and water ad libitum. Two mice of group 1 and six mice of group 2 survived at 18 weeks after the administration of the carcinogens. The necropsy was performed to all the mice that died or were killed at the regular intervals. The thymomas and other tumors were fixed in 4% paraformaldehyde solution and stained

with Hematoxylin-Eosin. Other small blocks of tumors were fixed with 2% glutaraldehyde in phosphate buffer, postfixed in 3% osmium tetroxide in phosphate buffer, and embedded in epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under H-300 electron microscope.

Tumors developed in 10 to 15 mice (66.6%) in 18 weeks after the single NMU injection. No tumor was found in group 1 mice surviving for 18 weeks, but four of the six surviving mice of group 2 had tumors.

All thymomas were identified as a lymphoid cell type microscopically. In the tissues, scarce epithelial reticular cells containing well-developed tonofilaments were seen but a large number of lymphocytes were observed.

#### **5. Ultrastructural study on secretory glycoconjugates of pancreatic cancer cells**

Nobuyuki NISHIMURA, Yoshiki KUBOTA, Seizi SAITO, Kyoichi INOUE and Akihara WATANABE

Third Department of Internal Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

The pancreatic carcinoma develops from the duct epithelium of the pancreas which has an ability to produce secretory conjugated sugars. Using the pancreatic cancer cell line derived from well differentiated adenocarcinoma, binding of lectins by the glycoconjugates of the cells was studied by light and electron microscopy. Cancer cells were isolated from the ascites of the carcinomatous peritonitis patient and the cell line of HuP-T4 was established by subculture. Tumor tissue specimens obtained by inoculation of HuP-T4 cells into the subcutis of nude mice were used for this study. Seven lectins were used ; WGA, RCA-1, PNA, Con A, UEA-1, SBA and DBA.

They were applied by direct and indirect methods. By light microscopy. WGA, RCA-1, PNA and UEA-1 stained the luminal cell border and the mucoid substance intensely and the cytoplasm in the intermediate degree. Con A was bound chiefly in the cytoplasm and no staining with DBA was shown. By electron microscopy, WGA, RCA-1, PNA and UEA-1 were localized at microvilli, secretory granules and Golgi apparatus. At the lateral plasma membrane, the reactions with WGA, RCA-1 and UEA-1 were revealed but no reactions with PNA. SBA showed an intense reaction at microvilli and secretory granules but DBA had no reaction.

From the above findings, the secretory glycoconjugates produced by HuP-T4 cell line have N-acetylgalactosamine (or sialic acid). D-galactose and fucose. Discrepancies in the distribution of the reactions with SBA and DBA both of which have a specificity to N-acetylgalactosamine are interesting.

#### **6. The reaction of sera from patients with mixed connective tissue disease with acid phosphatase positive phagocytes in the red pulp of the murine spleen**

Tetsu KAMITANI\*, Saburou YANO\*, and Kenichi TAKAYA\*

First Department of Internal Medicine\*, Second Department of Anatomy, Faculty of Medicine\*\* Toyama Medical and Pharmaceutical University

In the immunohistochemical study, we found that sera from patients with certain rheumatic diseases, particularly MCTD (mixed connective tissue disease), reacted with acid phosphatase positive phagocytes in the red pulp of the adult murine spleen. The reaction was due to Fab fragments of the IgG antibodies in the patients sera. The reactive antigen proved to be NaIO<sub>4</sub>

and RNase sensitive, suggesting it might be a RNA-associated antigen. What is this antigen? As a working hypothesis it was assumed that it might be a viral antigen, because it was RNase sensitive, and because almost all patient sera with the antibodies also contained the anti-U<sub>1</sub>-RNP antibody which reacts with a retroviral gene product. In the present study, we examined the red pulp macrophages of the murine spleen by using electron microscopy. In the cytoplasm of the macrophages, virus-like particles were observed. It is not known at present, however, whether or not these particles were related to the antigen reacting with the patient sera. Immunoelectron microscopic studies will be necessary to ascertain the relation.

#### 7. Immunocytochemical study of S-100 protein positive adherent cells obtained from human tonsils

Makoto KAWAGUCHI\*, Shin ISHIZAWA\*, Fuyumi SHIMODA\*\*\*, Hiroshi ODAKE\*\*, Takeshi SAKAI\* and Fumitomo KOIZUMI\*

Department of Pathology\*, Department of Oral and Maxillo-Facial Surgery\*\*, Section of Japanese Oriental Medicine\*\*\*, Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital

Both macrophages (M $\phi$ ) and dendritic cells (DC) are of a plastic adherent nature. We examined human tonsillar transiently adherent cells (TAC) using immunocytochemical double staining technique. Immunoreactivity for monoclonal antibodies [Anti-LeuM5(CD11c), DAKO-Macrophage, FMC32, Myeloid/Histiocyte Antigen (DAKO-MAC387)] was investigated on S-100<sup>+</sup> TAC. S-100<sup>+</sup> TAC were on the average 97% CD11c<sup>+</sup>, 86% DAKO-Macrophage<sup>+</sup>, 68% FMC32<sup>+</sup> and 0% DAKO-MAC387<sup>+</sup>. The distribution patterns of the above mentioned antibodies-positive cells in

the tonsil tissue were also examined. In the T-cell-dependent area, S-100<sup>+</sup> interdigitating cells (IDC) and MAC387<sup>+</sup> M $\phi$  were present. In addition, many scattered CD11c<sup>+</sup>, DAKO-Macrophage<sup>+</sup>, FMC32<sup>+</sup> cells were observed, each in a separate staining. With regard to the staining overlap in the analysis of TAC and distribution patterns of M $\phi$  and DC in the tonsil tissue, we reached two conclusions. First, most of the S-100<sup>+</sup> IDC in the T-cell-dependent area are immunoreactive for CD11c, DAKO-Macrophage and FMC32. Second, DAKO-MAC387<sup>+</sup> M $\phi$  and S-100<sup>+</sup> DC are completely separate cellular populations.

#### 8. Findings in pericardial pore formation

Yoshifumi FUKUO

Department of Anatomy Toyama Medical and Pharmaceutical University.

I have described the pericardial pores which communicate the pericardial cavity with pleural cavities. In order to investigate the formative process of the pores, the pericardium of the ddY mice from birth to 21 days was examined. Up to 6–7 postnatal days, the mice pericardium consisted of the mesothelial cell layer of the parietal pericardium, the mesothelial cell layer of the parietal pleura and the connective tissue sandwiched between them. Abundant pericardial pores made their appearance at 10–20 days after birth, cell processes from the mesothelial cells of one side towards those of another side developed to form cellular junctions connecting from the side developed to form cellular junctions connect heart side to the lung side. As a result, pericardium made tongue-like processes connected with each other at the tips. When the junctional contact of the processes separated, the pericardial pores were produced.

## 9. Scanning electron microscopic study of pili torti (twisted hairs)

Tomohiro MARUYAMA, Akihiro KANEI, Shozo TAKAHASHI and Masaaki MOROHASHI

Department of Dermatology Toyama Medical and Pharmaceutical University

We observed a case of the twisted hair of a sixteen year old Japanese girl who had suffered from large area of scanty, short and frizzled hairs by birth. We examined the specimen taken from her occipital region by light and scanning electron microscopy and obtained the following findings ;

- 1) A part of the hair shaft is flattened and the hair is twisted clockwise and anti-clockwise on its own axis.
- 2) Some hairs are knotted.
- 3) A knot develops at the twisted region.
- 4) Hair cuticles are easily dropped out by a friction.
- 5) Hairs were found which have longitudinal ruptures along the hair axis.
- 6) Morphological changes of the hair begin at the hair root.

7) Short hairs have a disruption at the flattened region, at the unflattened region, and at the knot and at the root of "branched hairs".

8) Light microscopy revealed a vacuolation of the cells and an irregularity of thickness in outer root sheath at the hair bulb.

9) Their upper part showed a morphological change at outer root sheath, inner root sheath and the lumen of the hair follicle.

10) There is a morphological change of the duct of the sebaceous gland.

11) By DACM staining, although there was no change in the hair shaft and inner root sheath, some eosinophilic pyknotic cells in the outer root sheath revealed abnormal conversion of SH groups to SS linkages in cellular protein.

From the above findings, the mechanism of the development of the morphological change of the twisted hairs of the present patient is caused by

- 1) Unequal development of the cells at the outer root sheath at the hair bulbs inducing a marked change of the inner root sheath and hair shaft in the upper part leads to the twisted hair.
- 2) Friability of the hair is chiefly due to its morphological changes.

## 第9回 富山医科薬科大学放射性同位元素実験施設利用者研究発表会(抄録)

日時 平成2年3月8日(木)

会場 附属病院臨床第二講義室

### 1. 連続定量振動の椎間板レオロジー学的、ならびに生物学的挙動に及ぼす影響

整形外科

石原裕和, 辻 陽雄, 平野典和, 大島 博, 寺畑信男

振動という機械的刺激がどのようなメカニズムで椎間板機能不全を引き起こすのか、振動に対する椎間板のレオロジー学的特性と生物学的応答の両面から、このメカニズムの解析を試みた。実験には新鮮豚尾椎間板—終板コンプレックスを用い、レオロジー学的特性をバイオメカニカルスペクトロメーターにより求め、また生物学的応答としてプロテオグリカン合成能、溶質移送に及ぼす影響をラジオアイソトープを用い検討した。静的荷重 5 N、振動荷重 3 N の振動負荷において椎間板には11Hz付近に共振周波数が存在し、散逸エネルギーは周波数増加に従って急激に増加した。この時、プロテオグリカン合成能は内層、外層線維輪であまり変化なく、髄核においてのみ10、35Hzで著明な減少をみた。溶質移送の面からは、特に髄核において振動に伴う移送の亢進が認められた。椎間板は振動エネルギーを吸収する能力を有するが、これが一方プロテオグリカン合成を低下させ、基質統合性の破綻、変性の加速につながる事が推察された。

### 2. Haloperidol 急性投与のラット脳グルコース利用に及ぼす影響について

精神神経科

安井伸一, 倉知正佳

Haloperidol(HAL) 急性投与後の local cerebral glucose utilization を、 $^{14}\text{C}$ -2-deoxyglucose を用いたオートラジオグラフ法により検討した。対象は覚醒ラット(ウィスターラット、8週齢) Control 生

食投与群 9 匹、HAL 0.25mg/kg 群 7 匹、HAL 1.0 mg/kg 群 7 匹で、左右それぞれ38部位を測定した。LCGU はほとんどの部位に於いて減少傾向を示し 0.25mg/kg 投与群では frontal area 2, 左の cingulate area 3, septum, 右の globus pallidus において有意の減少( $p<0.05$ )がみられ、又 1.0mg/kg 投与において neocortex のほとんど、mesocortex, paleocortex, hippocampus, globus pallidus, amygdala, ventral septum, tegmental area, inferior and superior colliculus および medial geniculate body で減少がみられた。これらは HAL の作用部位と推定される中脳皮質系と中脳辺縁系 dopamine 系に対する効果と考えられるが、変化は必ずしも DA neuron の分布とは一致せず、neural circuitry や serotonin など他の系への効果も考えられた。

### 3. マウス腫瘍細胞における $^{67}\text{Ga}$ 集積におよぼす イソプレノイド (L-623) の増強効果

RI 施設\*, 第2外科\*\*

前田正敏\*, 二本松博子\*, 岡本政広\*\*, 庄司美樹\*, 本田 昂\*

$^{67}\text{Ga}$  のマウス腫瘍細胞への集積におよぼすイソプレノイド (L-623) の効果について in vitro, in vivo で検討したので、報告する。培養腫瘍細胞 (colon adenocarcinoma 26, melanotic melanoma B16, Lewis lung carcinoma) に L-623 (最終濃度  $3.82 \times 10^{-2}\text{mM}$ ) を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、60分間インキュベートした。その後  $^{67}\text{Ga}$  溶液を添加し、腫瘍細胞に取り込まれる  $^{67}\text{Ga}$  の放射能を経時的に測定した。また担癌マウスに L-623 を 10mg/kg の割合で尾静脈に投与し、30分後に  $^{67}\text{Ga}$  溶液を同様に投与し経時的に  $^{67}\text{Ga}$  の体内分布を測定した。L-623 群は、コントロール群に比較して培養腫瘍細胞において2倍から4倍



高い  $^{67}\text{Ga}$  の集積がみられ、かつ colon adenocarcinoma 26 担癌マウスでは、腫瘍への集積が投与後 48, 72 時間でそれぞれ 1.44 倍, 1.56 倍増加していた。以上の結果より L-623 は腫瘍への  $^{67}\text{Ga}$  の取り込みを増強させる効果があることが示唆された。

#### 4. 培養系における骨吸収に対するカドミウムの促進作用

環境衛生

高田昌和, 宮原龍郎, 永井美由紀, 宮田雅紀,  
勝 朱美, 松下真理, 狐塚 寛

$^{45}\text{Ca}$  で prelabel した新生仔マウス頭頂骨を用いて Cd, Zn, Cu, Pb, Al の骨吸収に対する作用を検討したところ, Cd が  $0.5\mu\text{M}$  という低い濃度で  $^{45}\text{Ca}$  の放出とコラーゲンの分解を促進した。そこで Cd の骨吸収促進作用のメカニズムについて若干の検討を加えた。培地への  $\text{PGE}_2$  の放出は Cd により促進された。インドメタシン, コラゲナーゼ阻害剤 Cl-1 によって Cd による骨吸収促進は抑制された。これらの結果は Cd の骨吸収促進における骨芽細胞の関与を示唆する。破骨細胞を不動化させるカルシトニン, カテプシン B の阻害剤 E-64, アセタゾラミドは Cd による骨吸収促進を抑制した。これらのことから Cd の骨吸収促進作用は破骨細胞性の骨吸収によると示唆された。一方, マウス骨髄細胞培養系においても  $0.06\mu\text{M}$  以上の Cd が酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ陽性の多核細胞の形成を促進し, その促進はインドメタシンで抑制された。以上より Cd は骨芽細胞を介した破骨細胞性骨吸収を促進し, その機序として  $\text{PGE}_2$  産生と破骨細胞形成の促進が考えられた。

#### 5. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識微粒子活性炭の開発と臨床応用

第 2 外科\*, 放射線科\*\*, RI 施設\*\*\*

佐伯俊雄\*, 唐木芳昭\*, 前田正敏\*\*\*,  
瀬戸 光\*\*, 本田 昂\*\*\*, 藤巻雅夫\*

乳癌術式の縮小化傾向に伴い合理的リンパ節郭清方法の確立が望まれており, リンパ流解析はその一助になるものと考えられる。今回我々は, リンパ流解析用製剤としてリンパ指向性, 肉眼的識別能に優

れ, 定量的分析も可能な  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識微粒子活性炭を作製したので報告する。本製剤の作製は EDTA complex 法を用いて行った。調製時の標識率は  $97.7 \pm 2.6\%$  であり 24 時間経過後も  $94.9 \pm 2.5\%$  と安定した製剤であった。ラット生体内における本製剤の安定性の検討では, 25 匹のラットより摘出した黒染, 非黒染腹部リンパ節の放射能に有意差を認め, 本製剤の生体内での安定性が確認された。さらに, 臨床的に本製剤を用いて乳腺リンパ節シンチグラフィの試みと手術症例におけるリンパ流解析を行いつつあり, 若干の知見を得たので, 報告した。

#### 6. レンチナン包埋リポソームのラット肝転移抑制効果

RI 施設\*, 第 2 外科\*\*, ウイルス\*\*\*

川腰利之\*, 前田正敏\*, 本田 昂\*, 山下 巖\*\*,  
田澤賢次\*\*, 増山喜一\*\*, 岡本政広\*\*, 藤巻雅夫\*\*,  
落合 宏\*\*\*

DDS (Drug Delivery System) のキャリアーとして注目されているリポソームと BRM (Biological Response Modifiers) の一つであるレンチナンを用いて, レンチナン包埋リポソームを作製し, その予防的投与のラット肝転移に対する抑制効果を検討した。リポソームは逆相蒸発法により等モルの egg phosphatidylcholine と cholesterol を用いて作製した。このリポソームは in vitro および in vivo で安定であり, 肝臓や脾臓のような網内系に顕著に取り込まれた。そこでこのリポソームにレンチナンを包埋し前投与した結果, レンチナン包埋リポソーム群ではレンチナンやリポソームの単独群および生食群に比べて AH60C 腫瘍細胞移植日の肝臓および脾臓の NK 活性が 1.2~2.3 倍に増強された。またレンチナン包埋リポソーム群では同細胞 ( $2 \times 10^6$  個) の移植による肝転移に対して, 他の群に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) な抑制効果が認められた。これらのことからレンチナン包埋リポソームの予防的投与はレンチナン単独投与に比べて肝臓, 脾臓の NK 活性を良好に賦活し, さらに肝転移抑制に対しても有効である可能性が示唆された。

## 7. 消化器癌手術後に発生する肝転移の予防的治療

第2外科\*, RI施設\*\*

笠木徳三\*, 田澤賢次\*, 藤巻雅夫\*, 前田正敏\*\*,  
本田 昂\*\*

消化器癌の手術後に発生する再発の中で、特に肝転移による再発に対し、予防的な治療を種々の biological response modifier を用いて検討した。このうち、OK-432の実験的肝転移に対する抗腫瘍効果について若干の知見が得られたので報告する。OK-432の投与は経口、門脈内の2方法について実験を行った。門脈内投与により約36~41%、経口投与により約53%の転移抑制を認めた。また、経口投与については、中鎖脂肪にてエマルジョン化して投与することで、吸収増強と転移抑制の増強を得られることが認められることが認められた。以上より、臨床での効果が期待されている。

## 8. 放射線ホルミシス—微量放射線の生物刺激効果について

RI施設 本田 昂

一般に電離放射線の低線量域における生物学的影響は、高線量域でみられるものと同様であろうと考えられている。しかしながら、近年、低線量被曝は生体に刺激作用をおこすという放射線ホルミシスの概念が提唱されている。ホルミシス線量は、発育の促進、疾病および余後の放射線に対する抵抗力の上昇、生殖能力の増大および寿命の延長を生じさせるという。即ち放射線ホルミシスは、既知の有害線量からゼロへの直線的外挿の妥当性を否定するものであり、従来の放射線科学のパラダイムとは相容れないものであるが、ホルミシス効果を示すデータは無視できない知見と考えられる。

低線量域における放射線生物作用を中心に放射線ホルミシスについて紹介した。

# 第16回 富山医科薬科大学血管懇話会（記録）

## 皮膚リンパ管の構造と機能

Daroczy Judit, M. D.

Semmelweis大学医学部

Kallai-Eva皮膚科病院院長

皮膚真皮に分布するリンパ管の微細構造と機能について述べた。リンパ管の形態学的特徴として以下の5点を挙げることができる。① 薄い内皮を有する脈管である。② 基底膜を欠くか、存在しても不連続である。③ 内皮細胞の overlapping がある。

④ 内皮細胞間に open junction を認めることができる。⑤ anchoring filament の存在。⑥ 弁の存在。これらのうち①は脈管としての必要条件であり。②~⑤はリンパ管の特徴である拡張能力を形態学的に裏づけている。⑥は one way drainage system としてリンパ液の逆流を防ぐための構造で、演者は形態学的にこれらを集合弁、分節弁、単細胞弁、皺襞弁、及び流入弁の5型に分類した。これらの弁はすべて内皮細胞の折り返しからなっており、必要に応じて新たに形成され、あるいは消失を繰り返していると考えられる。

（第1病理，岡田英吉記）

## 雑 報

### 学 位 授 与

#### 課 程 博 士

##### 平成元年度

杉 本 裕 史(富 山 県)	Apatite 2-piece implant の咬合負担能力に関する実験的研究	歯科口腔外科
松 崎 恒 一(富 山 県)	ヒト胆管癌培養細胞による basic fibroblast growth factor の産生に関する研究	第 3 内 科
湖 東 慶 樹(富 山 県)	急性大動脈解離における血清酵素の経時的変化に関する検討	第 1 外 科
森 岡 尚 夫(石 川 県)	非肥満ヒト II 型糖尿病の動物モデル NON マウスの耐糖能異常の成因に関する研究	第 1 内 科
市 村 和 徳(長 野 県)	Cell culture of the intravertebral disc of rats —factors influencing culture, and proteoglycan, collagen and DNA synthesis—	整 形 外 科
北 川 秀 機(富 山 県)	Origins and conducting pathways of motor evoked spinal cord potentials elicited by transcranial (vertex-hard palate) stimulation in cats	整 形 外 科
田 村 了 以(群 馬 県)	Single neuron responses in alert monkey hippocampal formation to complex sensory stimuli during cognitive behavior	第 2 生 理
沼 田 このみ(富 山 県)	家兎虹彩アルゴンレーザー光凝固の房水成分および眼圧に及ぼす影響に関する研究	眼 科
福 尾 吉 史(富 山 県)	The distribution of lymphatic stomata in the diaphragm of the golden hamster	第 1 解 剖
小 林 政(新 潟 県)	ブタ大動脈由来培養内皮細胞表面のヘパリン様物質に対する、ヒト組換えサイトカイン（インターロイキン 1 および腫瘍壊死因子）の影響	臨 床 検 査
檀 彰(愛 知 県)	延髄呼吸性ニューロンにおける抑制性伝達物質に関する神経薬理学的研究	薬 理
齊 藤 智 裕(神 奈 川 県)	腫瘍壊死因子と温熱療法の併用効果の基礎的研究	第 2 外 科
辻 本 優(富 山 県)	非小細胞肺癌患者における腫瘍細胞核 DNA index 測定の意義	第 1 外 科

西 出 良 一(石 川 県)	担癌生体における血清蛋白分画の異同に関する研究 ——高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography) による癌患者血清等の蛋白分画解析の癌血清診断への応用——	第 1 外科
神 谷 哲(山 口 県)	Identification of the cells in murine splenic red pulp of reacting with the antibody in MCTD patient sera, and characterization of the antigen in these cells.	第 1 内科
沢 丞(東 京 都)	Molecular cloning and DNA sequence analysis of prepro-insulin genes in the NON mouse, an animal model of human non-obese, non-insulin-dependent diabetes mellitus	第 1 内科
森 蔭 俊 彦(大 阪 府)	Prevention of fatal infections by recombinant human interleukin-1 $\alpha$ in normal and anticancer drug-treated mice	第 1 内科

## 学 位 授 与

### 論 文 博 士

平成元年度

大 橋 直 樹(新 潟 県)	Prediction in smooth pursuit	耳 鼻 科
檜 山 幸 孝(茨 城 県)	パーキンソン病患者に対するドーパミン産生細胞脳内移植術の適応病態に関する基礎的研究	和漢診療部
今田屋 章(長 崎 県)	Erythrocyte antioxidant enzymes are reduced in patients with rheumatoid arthritis	和漢診療部
三 瀧 忠 道(東 京 都)	大黃並びに大黃含有方剤による慢性腎不全の治療に関する研究	和漢診療部
土 佐 寛 順(埼 玉 県)	桂枝茯苓丸 <sup>けいしふくりゅうかん</sup> の作用機序に関する血液レオロジー的研究	和漢診療部
岩 井 良 成(石 川 県)	Relation of supersensitivity to cerebral vasospasm induced by oxyhaemoglobin	脳神経外科
吉 田 淑 子(富 山 県)	Follicular dendritic reticular cells in the germinal center of the rat lymph node as studied by immunoelectron microscopy	第 2 解剖
足 立 雄 一(鳥 取 県)	年少児における気道過敏性の検討	小 児 科
秋 谷 徹(東 京 都)	ACNU と高圧酸素によるラット実験膀胱腫瘍発生の抑制効果	泌尿器科
嶋 尾 智(富 山 県)	尿中低分子蛋白の排泄動態からみた新生児期尿細管機能発達に関する研究	小 児 科
富 川 正 樹(富 山 県)	Total exclusion technique and anatomical reconstruction for the treatment of abdominal aortic aneurysms	第 1 外科

青 山 圭 一(富 山 県)	Immunohistochemical investigation of hepatitis B virus associated antigens, HLA antigens and lymphocyte subsets in type B chronic hepatitis	第 3 内 科
稲 場 進(富 山 県)	各種腎疾患におけるⅢ型, Ⅳ型及びⅤ型膠原線維の局在に関する研究	小 児 科
窪 田 芳 樹(長 野 県)	Electron microscopic histochemistry of lectin binding sites in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice	第 3 内 科
古 田 秀 勝(富 山 県)	正常ラット副腎およびヒト副腎におけるカテコールアミン $\alpha$ 受容体の研究	泌 尿 器 科
井 原 典 成(石 川 県)	デュアルトレーサー法によるラットモデル代謝性骨疾患の定量的評価	放 射 線 科
康 山 俊 学(富 山 県)	各種肝疾患および実験的肝障害における肝組織中の Cu, Zn 型 Superoxide dismutase の免疫組織化学的研究	第 3 内 科
笠 木 徳 三(岐 阜 県)	Biological response modifier による消化管悪性腫瘍の肝転移に対する予防的治療: OK-432 門脈内投与による実験的肝転移抑制に関する基礎的研究	第 2 外 科
吉 岡 勉(富 山 県)	Motion characteristic of the completely normal lumbar spine in young adults : instantaneous axis of rotation and vertebral center motion analyses	整 形 外 科
高 野 治 雄(富 山 県)	Origin and conducting tracts of evoked spinal cord potentials elicited by peripheral nerve stimulation in cats	整 形 外 科
佐 伯 俊 雄(富 山 県)	$^{99m}\text{Tc}$ 標識微粒子活性炭の開発と臨床応用	第 2 外 科

## 富山医科薬科大学医学会会則

第 1 条 本会を、富山医科薬科大学医学会という。

第 2 条 本会は、富山医科薬科大学における医学研究の振興に寄与することを目的とし、その使命達成に必要な事業を行う。

1. 学術集会の開催
2. 学会誌の刊行
3. その他本会の目的達成に必要な事業

第 3 条 本会は前条の趣旨に賛成するものをもって組織する。

第 4 条 本会は、北陸医学会の会員となるものとする。

第 5 条 本会の事務所を、富山医科薬科大学におく。

第 6 条 本会に次の役員をおく。

- |      |     |     |
|------|-----|-----|
| 1. 会 | 長   | 1 名 |
| 2. 副 | 会 長 | 2 名 |
| 3. 理 | 事   | 若干名 |
| 4. 監 | 事   | 若干名 |
| 5. 評 | 議 員 | 若干名 |

会長は、会務を総理し、会議の議長となる。

副会長は、会長を補佐する。

理事は、庶務・会計・集会・編集の会務を分担する。

監事は、経理を監査する。

評議員は、会長の召集を受け、本会の重要事項を審議する。

第 7 条 役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

第 8 条 役員は、次の方法によって選出する。

1. 会長、副会長、理事及び監事は、評議員の中から互選する。
2. 評議員は、会員中の教授ならびに教室員代表に委嘱する。
3. 役員の改選は3月に行うものとする。ただし、任期中に欠員を生じた場合は、この限りでない。

第 9 条 本会の事業年度は、年度制による。

第 10 条 本会の経費は、会員の会費、寄附金その他の収入をもってあてる。会費は1ヶ年3,000円とし、事業年度の当初に納入するものとする。

第 11 条 本会の事業内容ならびに会計については、毎年度の評議員会にこれを報告する。

第 12 条 本会会則の改変には評議員の審議を要し、出席者の過半数の賛成を必要とする。

第 13 条 本会則の実施に必要な細則は、別に定める。

### 付 則

この会則は、昭和54年4月1日より施行する。

昭和63年12月3日一部改変。

## 富山医科薬科大学医学会役員

### 役 員 (敬称略)

会 長 片 山 喬 昭和62.11～  
副会長 庭 山 清八郎 昭和62.4～平成2.3  
山 本 恵 一 平成2.4～  
理 事  
庶 務 庭 山 清八郎 昭和62.4～平成2.3  
山 本 恵 一 平成2.4～  
田 澤 賢 次 昭和62.4～  
会 計 小 泉 富美朝 昭和62.4～  
川真田 聖 一 昭和62.4～  
集 会 山 本 恵 一 昭和54.4～平成2.3  
岡 田 敏 夫 平成2.4～  
瀬 戸 光 平成元.12～  
編 集 川 崎 匡 昭和54.4～  
上 村 清 昭和62.3～  
飯 田 博 行 昭和63.4～

### 監 事

本 田 昂 昭和62.4～  
久 世 照 五 昭和62.4～

### 北陸医学会副会長

佐々木 博 昭和63.8～

### 評議員 (50音順)

飯田 博行, 伊藤 祐輔, 泉 陸一,  
小野 武年, 大星 光史, 岡田 敏夫,  
鏡森 定信, 加須屋 実, 柿下 正雄,  
片山 喬, 上村 清, 金子 基之,  
川崎 匡, 川真田聖一, 北川 正信,  
久世 照五, 窪田 靖夫, 倉知 正佳,  
小泉富美朝, 小西 健一, 桜井 芳雄,  
佐々木 博, 篠山 重威, 櫻川 信男,  
瀬戸 光, 田澤 賢次, 高久 晃,  
高畠 紀夫, 高屋 憲一, 武田 龍司,  
瀧沢 久夫, 辻 陽雄, 寺沢 捷年,  
豊富 誠三, 中西 穎央, 永田 正典,  
南部 徳盛, 庭山清八郎, 平賀 紘一,  
藤岡 基二, 藤巻 雅夫, 古田 勲,  
堀越 勇, 本田 昂, 森 康尚,  
諸橋 正昭, 水越 鉄理, 矢野 三郎,  
山本 恵一, 渡辺 明治

## 「Toyama Medical Journal」投稿規定

1 投稿資格 原則として富山医科薬科大学医学  
会会員に限る。

2 投稿の種類 総説、原著、症例報告、短報、お  
よび当地方で開催され、編集委員会が適当と  
認めた学会などの記録および抄録など、原稿  
表紙に明記する。

3 執筆規定 以下の規定に従う。

### A 和文論文

a) 原稿の形式 表紙、和文要旨、本文、文献、  
英文抄録、表、図の順とし、コピー2部とと  
もに提出する。

b) 用紙と長さ 用紙はB5版横書400字詰原稿用  
紙を用いる。またはワープロの原稿とする。  
原著および症例報告の長さは400字詰原稿用  
紙15枚以内、原則として図表5枚以内。総説  
の長さは400字詰原稿用紙30枚以内、図表10  
枚以内。

c) 表紙の記載順序 投稿の種類、和文題名、著  
者名、所属名、英文題名、ローマ字の著者名  
(例 Tadashi KAWASAKI)、英文所属名、  
内容索引用 Key words (英文、5語以内) 20  
字以内のランニングタイトル、本文総枚数、  
表、図の各枚数、別刷希望数(50部単位、朱  
書)とし、編集部への希望事項は別紙に記入  
添付する。

d) 和文要旨と英文抄録 和文要旨は400字以内  
とする。英文抄録は200語以内でダブルス  
ペースでタイプする。

e) 本文の形式 原著の項目ははじめに、材料お  
よび方法、結果、考察の順とするかこれに準  
じた形式がのぞましい。各項目の細分は次の  
ようにする。I, II, ……、A, B, ……、  
1, 2, ……、a, b, ……、(1), (2), ……、  
図表の説明は原則として英文とする。謝辞ま  
たはこれに準じるものは本文末尾に記載する。

f) 書体と用語 現代かなづかいのひらがな、当  
用漢字を用い、十分に推敲した原稿とする。  
乱雑な原稿は受け付けない。句読点、括弧は

正確につけ1字分としてあける。本文中の英  
文単語はタイプで打つか活字体で記す(原則  
として語頭は文中では小文字、文頭でのみ大  
文字)。学名にはアンダーラインを付す。術語  
は日本医学会用語委員会制定の用語を用いる。

g) 度量衡の単位および略号 単位は国際単位  
(S.I.)を用い、ピリオドをつけない。次の例  
に準ずる。[長さ] m, cm, mm,  $\mu$ m, nm,  
 $\text{\AA}$ 。[重さ] kg, g, mg,  $\mu$ g。[面積]  $\text{m}^2$ ,  
 $\text{cm}^2$ ,  $\text{mm}^2$ 。[体積]  $\text{m}^3$ ,  $\text{cm}^3$ ,  $\text{mm}^3$ 。[容積]  
l, ml,  $\mu$ l。[モル数・濃度等] mol, mmol,  
 $\mu$ mol, nmol, pmol, M (mol/liter), Eq,  
N (normal), %。[時間] d (日), h (時),  
min (分), s (秒), ms,  $\mu$ s。[温度]  $^{\circ}\text{C}$ 。  
[圧力] mmHg, mbar。[電気] V (volt),  
A (ampere), Hz (cycles/sec)。[放射線] Ci,  
cpm, r (röntgen), [その他] g (gravity),  
LD<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub> (median doses)。[光学異性体]  
d-, l-, dl-。[投与方法] iv, ip, im, sc, po。  
[統計] SD, SEM。

h) 文 献 引用順に本文中の引用箇所右肩  
に片括弧(例…… Sasa<sup>1)</sup>)で番号を付し、次  
の例の記載法で末尾に番号順にまとめる。著  
者が5名以上の場合は最初の3名を記し、あ  
とは「ほか」(英文では et al.)とする。とく  
に句読点に注意する。

和文原著文献

1) 久世照五, 八木欲一郎, 伊藤祐輔ほか:  
[1-<sup>14</sup>C]-酢酸・Na 投与後の呼気 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 排  
出と <sup>14</sup>C 体内分布. 麻酔 34: 349-655,  
1985.

和文単行本

2) 田沢賢次: ストーマの合併症とその対策  
—皮膚傷害—. ストーマケア基礎と実際  
(ストーマリハビリテーション講習会実行  
委員会 編): 209-225. 金原出版, 東京,  
1986.

英文原著文献



- 3) Kamimura K., Takasu T. and Ahmed A. : A survey of mosquitoes in Karachi area, Pakistan. J. Pakistan Med. Ass. **36** : 181-188, 1986.

英文単行本

- 4) Nakata T. and Katayama T. : Changes in human adrenal catecholamines with age. In : Urology (Jardan, A. ed.) : 404-406. International B'Urologie, Paris, 1986.

引用雑誌の略称は「日本自然科学雑誌総覧」および“INDEX MEDICUS”に準ずる。

- i) **表, 図** 大きさの限度は刷り上がり1頁以内におさまるものとし, 本文とは別にまとめ, Table 1, Fig. 1 として, 本文中に挿入すべき場所を明記する。図は白紙または薄青色方眼紙に図中の文字を含み黒で原則としてそのまま凸版原図となるよう清書する。図表およびその説明は原則として英文とする。

## B 欧文論文

- a) **原稿の形式** 表紙, 英文抄録, 本文, 文献, 和文要旨, 表, 図の順とし, コピー2部とともに提出する。
- b) **用紙と長さ** A4版タイプ用紙にタイプまたはワープロで打つ。ダブルスペースで1頁25行, 12頁以内。原則として図表5枚以内。
- c) **表紙の記載順序** 欧文題名, 欧文著者名, 欧文所属名, Key words 5語(英文), 40字以内の欧文ランニングタイトル, 本文総枚数, 和文題目, 和文著者名, 和文要旨, 表, 図の

各枚数, 別刷希望数(50部単位, 朱書)とし, 編集部への希望事項は別紙に記入添付する。

- d) **英文抄録と和文要旨** 英文抄録はダブルスペースでタイプし200語以内。和訳原稿をつける。和文要旨は400字以内とする。
- e) **本文の形式** 度量衡の単位および略号, 図表は和文原稿 e) g) i) にそれぞれ準拠する。
- f) **文献** 和文原稿 h) の欧文原著文献と欧文単行本に準拠する。
- g) **費用** 校閲料(添削料)を請求することがある。

- 4 **原稿の依頼, 採否, 掲載順序** 編集委員会が決定する。編集委員会は富山医科薬科大学医学会編集幹事, 編集委員と富山医科薬科大学医学会会長で構成する。論文は2名以上の編集委員または編集協力者により査読される。

- 5 **校正** 初校を著者の責任において行う。原則として原文の変更追加は認めない。

- 6 **掲載料, 別刷費用** 本文・図表を含め刷り上がり6頁までは1頁当たり5,000円以下, 7頁以上10頁までは1頁につき9,000円以下, 11頁を超えるものは実費を請求する。アート紙, カラー写真などの印刷で, とくに費用を要する印刷を希望する場合には著者が実費を負担する。別刷は50部まで無料, それ以上の別刷費用は送料を含め, 著者負担とする。

- 7 **原稿の送り先** 〒930-01 富山市杉谷2630  
富山医科薬科大学附属図書館内  
Toyama Medical Journal 編集委員会  
昭和63年1月5日制定

## 第2巻1号 訂正

	誤	正
57頁 見出し5行目	昭和60年度	→ 昭和61年度
58頁 見出し3行目	昭和61年度	→ 昭和62年度

## 編集後記

富山医科薬科大学医学会発展のために寄与すると云う発行の初志のもと、会員皆様のご協力により、ここに第3号をお手元にお届けできることになりました。

恒例の医学会シンポジウム中心の編集には変わりありませんが、学位論文2編を掲載しておりますほか、今回から、学内各研究会の抄録を掲載することにした点ですこしは変化があったものと思っております。今後さらに充実させていくために、会員皆様の一層のご

協力を期待する次第です。

また、今期限りでご退官のウイルス学講座教授庭山清一郎先生には長年ご苦勞様でした。最後に、解剖学第一講座教授松田健史先生は任期半ばに病に倒れられ、御療養中でしたが、平成元年9月27日亡くなりました。先生の生前の教育・研究についての御業績ならびに「しらゆり会」での御活躍を偲んで編集委員一同心から哀悼の意を捧げます。

(川崎 匡)

### 編集委員

川 崎	匡(委員長)
飯 田 博 行	久 世 照 五
上 村 清	高 田 正 信
川真田 聖 一	田 澤 賢 次

## 富山医科薬科大学医学会誌

第3巻 第1号

発行日 平成 2 年 3 月

編集発行 富山医科薬科大学医学会  
富山市杉谷2630番地  
〒930-01

TEL (0764)34-2281(代)

印刷 あけぼの企画株式会社  
富山市住吉町1丁目5-18  
〒930

TEL (0764)24-1755(代)

